



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de los estados de espín de los hierros de los citocromos tipo *c* en la alcohol deshidrogenasa (ADH) de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* fijadora de nitrógeno.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

Sánchez Ostría Malinali



CIUDAD DE MÉXICO, 2019



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. Silvia Elena Castillo Blum

VOCAL: Dra. Martha Elena Sosa Torres

SECRETARIO: Dr. Alejandro Solano Peralta

1er. SUPLENTE: M. en C. Adrián Espinoza Guillen

2do. SUPLENTE: M. en C. Alan Ulises Mendieta Martínez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 212, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

Asesor del tema

Dra. Martha Elena Sosa Torres

Sustentante

Malinali Sánchez Ostría

Glosario de términos y abreviaturas

ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosíntrifosfato
FAD	Flavina adenina dinucleótido
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno
g	Factor espectroscópico o factor de desdoblamiento de Landé
g_x, g_y, g_z	Componentes <i>en</i> x, y, z del tensor- g .
<i>Ga. diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GADH	Gluconato deshidrogenasa
NAD(P)	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ•	Radical semiquinona
PQQH ₂	Pirroloquinolina quinona reducida
PQQ-ADH	Alcohol deshidrogenasa dependiente de PQQ
h	Constante de Planck (6.63×10^{-34} J·s)
I	Espín nuclear
J	Constante de acoplamiento de intercambio
kDa	Kilodaltones
m_s	Momento de espín
RPE	Resonancia Paramagnética electrónica
S	Espín total
SUI	Subunidad I

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ABREVIATURAS

SUII	Subunidad II
UQ	Ubiquinona
UQH ₂	Ubiquinona reducida
UV-Vis	Ultravioleta visible
[2Fe-2S] ⁺	Cúmulo tipo ferredoxina en estado reducido
ϵ	Coefficiente de absorptividad molar
λ	Longitud de onda
H	Campo magnético
B	Campo magnético externo
E	Energía

INTRODUCCIÓN	11
1. CAPÍTULO 1. Antecedentes.....	12
1.1. Bacterias ácido acéticas.....	12
1.2. Fijación biológica de nitrógeno en bacterias acid acéticas (BBA)	16
1.3. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	¡Error! Marcador no definido. 7
1.4. La PQQ – ADH de la <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19
1.4.1. Cofactores de la PQQ – ADH de la <i>Ga. diazotrophicus</i>	20
1.4.1.1. Pirroloquinolina quinona (PQQ)	21
1.4.1.2. Cúmulo [2Fe-2S]	22
1.4.1.3. Hemos tipo c.....	26
1.4.2. Fundamentos de RPE.....	30
1.4.2.1. RPE de hemos tipo c	34
1.5. Estudio de la PQQ – ADH de la <i>Ga. diazotrophicus</i>	36
2. CAPÍTULO 2. Objetivos.....	40
2.1 Objetivos generales	40
2.2 Objetivos particulares.....	40
3. CAPÍTULO 3. Parte Experimental.....	41
3.1 Material biológico.....	41
3.2. Medios de cultivo a pequeña escala	41
3.2.1. Tinción de Gram	41
3.2.2. Preservación de la bacteria <i>Ga. diazotrophicus</i>	42
3.2.3. Medios de cultivo a gran escala	43
3.3. Purificación de la PQQ-ADH de la <i>Ga. diazotrophicus</i>	44
3.3.1. Columna QAE-Toyopearl	45
3.3.2. Columna DEAE-Toyopearl.....	45
3.3.3. Columna Hidroxiapatita Ultrogel.....	45
3.3.4. Columna S-100.....	45
3.4. Caracterización molecular	46
3.4.1. Electroforesis (SDS-PAGE)	47
3.5. Cuantificación de proteína	47
3.6. Ensayos para deshidrogenasas.....	47

3.7. Caracterización espectroscópica	48
3.7.1 Análisis de los grupos prostéticos PQQ y hemos tipo <i>c</i> por espectroscopia electrónica UV-visible	48
3.7.2. Análisis de los grupos prostéticos PQQ y hemos tipo <i>c</i> por RPE de la PQQ-ADH aislada y purificada	48
3.7.3. Análisis redox de la enzima PQQ-ADH.....	48
4. CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
4.1. Medios de cultivo a pequeña escala	50
4.1.1 Tinción de Gram	50
4.2. Medios de cultivo a gran escala	51
4.2.1. Densidad óptica	51
4.2.2. pH.....	53
4.2.3. Aireación en el medio.....	55
4.3. Obtención de la enzima PQQ-ADH	56
4.4. Purificación de la PQQ-ADH de la <i>Ga. diazotrophicus</i>	58
4.4.1. Cromatografía en columna.....	58
4.4.1.1. Columna QAE-Toyopearl	58
4.4.1.2. Columna DEAE-Toyopearl.....	59
4.4.1.3. Columna Hidroxiapatita Ultrogel.....	60
4.4.1.4. Columna S-100.....	61
4.5. Caracterización molecular	63
4.5.1. Electroforesis (SDS-PAGE)	63
4.6. Análisis de los grupos prostéticos PQQ y citocromos tipo <i>c</i> por espectroscopía electrónica UV-visible	65
4.6.1. Análisis de los grupos prostéticos PQQ, [2Fe-2S] y citocromos tipo <i>c</i> por RPE de la PQQ-ADH aislada y purificada	68
4.6.2. Analisis redox d ela enzima PQQ-ADH.....	72
5. CAPÍTULO 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	88

En este trabajo, se exhiben los resultados acerca del estudio de los estados de espín de los hierros de los citocromos tipo *c* en la alcohol deshidrogenasa (ADH) de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* fijadora de nitrógeno.

La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* es aerobia estricta, Gram negativa, se caracteriza fenotípicamente por su capacidad de oxidar alcohol a ácido acético por medio de dos reacciones sucesivas catalizadas por las enzimas alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH), en medios de cultivo enriquecidos. A este conjunto de reacciones se les denomina fermentación oxidativa. Otro proceso de suma importancia que lleva a cabo esta bacteria es la fijación biológica de nitrógeno, en condiciones microaerofílicas a pH ácido.

La PQQ-ADH es una enzima de membrana tipo III dependiente de PQQ, está constituida por dos subunidades, la primera subunidad es la más pesada con 72kDa, la cual contiene 3 cofactores: un PQQ, un cúmulo [2Fe-2S] y un grupo hemo tipo *c* y la segunda subunidad con un peso de 44 kDa con 3 grupos hemo tipo *c*, todos estos interviniendo en la transferencia electrónica.

Los grupos hemo tipo *c* pertenecen a la cadena transportadora de electrones, son proteínas periféricas de bajo peso molecular también conocidos como metaloporfirinas, tienen un anillo compuesto de 4 pirroles, llamado porfirina, que encierra un átomo metálico, en este caso hierro, por enlaces coordinados. El hierro central del anillo hemo de los citocromos transporta un electrón, pasando de su forma reducida hierro(II), a su forma oxidada hierro(III).

En este proyecto se hizo uso de: espectroscopia paramagnética electrónica, titulación redox y espectroscopia UV-vis para analizar el estado de espín de cada uno de los citocromos tipo *c* que intervienen en el transporte de electrones de la cadena respiratoria de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES.

1.1. Bacterias ácido acética.

Las bacterias ácido acéticas (BAA) son un grupo de microorganismos aerobios estrictos¹, que tienen la característica singular de oxidar alcohol a ácido acético y de esta capacidad diferencial se origina su nombre.

Al microscopio, las BAA son Gram negativas², de entre 0.4 y 4.5 µm de largo y entre 0.4-1 µm de ancho, con forma elipsoidal y que pueden presentarse de manera individual, en parejas o en cadenas. Presentan flagelos de forma peritroca o polar, y no pueden formar endosporas como estructura de supervivencia. Generalmente, las BAA son catalasa positiva, oxidasa negativa y pueden utilizar el etanol como fuente de carbono. Su pH óptimo de crecimiento está entre 5 y 6,5, si bien puede llegar a crecer a pH cercanos a 3³.

Su pH óptimo es 5.5 a 6.3⁴, sin embargo, pueden sobrevivir en un ambiente ácido con pH de 3.0-4.0⁵. Por último, la temperatura óptima de crecimiento es de 25- 30 ° C.

Las BAA están especializadas en la rápida oxidación de azúcares y alcoholes, produciendo los ácidos orgánicos correspondientes. 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-sorbosa⁶, para esto necesitan de oxígeno como aceptor final de electrones, teniendo

¹ König H., Uden G., Fröhlich J. Guillamón J, M. (2009). Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine. Chapter 2: Acid Acetic Bacteria. Ed *Springer-Verlog*. pp 30

² Hanmoungjai W., Chukeatirite E., Pathom-aree W., Yamada Y., Lumyoung S. (2007). Identification of Acido tolerant Acetic Acid Bacteria Isolated from Thailand Sources. *Research Journal of Microbiology*. pp 194-197

³ Mssena R., V and Dos Santos T., K., R. (2015). Nitrogen fixing bacteria in the family *Acetobacteraceae* and their role in agriculture. *Journal of Basic Microbiology*. 55, 931-949.

⁵De Ley J, Gossele F, Swings J (1984) Genus I *Acetobacter*. In: Krieg NR, Holt JG. *Manual of Systematic Bacteriology*. 1, pp 268–274.

⁵ Du Toit WJ, Pretorius IJ. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annual Microbiology*. 52, pp 155–179.

⁶ Komagata K., Lino T., Yamada Y. (2014). The family *Acetobacteraceae*. *The prokaryotes. Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, Ed. 4ta *Springer-Verlag*.pp 549-734.

un metabolismo aerobio obligado. La disponibilidad de oxígeno juega un papel fundamental en su crecimiento y actividad⁷.

Esta reacción de oxidación se conoce como "fermentación oxidativa", derivándose de la oxidación incompleta del sustrato acompañada por la acumulación de grandes cantidades del producto de oxidación correspondiente en el medio de cultivo⁸.

Hay dos tipos de sistemas enzimáticos capaces de realizar reacciones de deshidrogenación y que pueden ser funcionales en la misma bacteria⁹. Estos sistemas de enzimas difieren en la localización y función dentro de la célula.

El primer sistema, la vía oxidativa directa, involucra la oxidación no fosforilativa de azúcares, polioles, alcoholes alifáticos y cíclicos, en mayor proporción.

En el segundo sistema, las reacciones se dan por enzimas oxidorreductasas capaces de catalizar la oxidación de alcoholes y se pueden clasificar en cuatro grupos dependiendo del grupo prostético que posean¹⁰:

1. Enzimas que contienen pirroloquinolina quinona (PQQ) o quinoproteínas. Pueden además incluir grupos hemo.
2. Enzimas que contienen flavina adenina dinucleótido (FAD)
3. Enzimas que contienen nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) (NAD(P)) y suelen subdividirse en enzimas de cadena corta, activadas por Fe y enzimas que contienen Zn.
4. Enzimas que contienen grupos hemo y el factor F420.

Las BAA de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, se caracterizan por su capacidad de oxidar etanol a ácido acético y la alta resistencia al mismo, especies de los géneros 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

⁷ Saichana N., Matsushita K., Adachi O., Frébert I., Frebortova J. (2015). Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 33, pp 1260-1271.

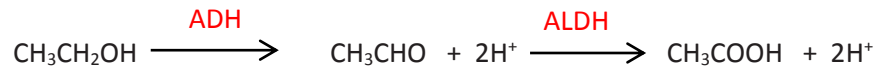
⁸ Adachi O., Moonmangmee D., Toyama H., Yamada M., Shinagawa E., Matsushita K. (2003) New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 60, pp 643-653.

⁹ Matsushita K., Toyama, H. and Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances Microbial Physiology*. 36, pp 247-297.

¹⁰ Gvozdev, A.R., Tukhvatullin, I.A., Gvozdev, R.I. (2012). Alcohol deshidrogenasas dependientes de quinona y alcohol oxidasas dependientes de FAD. *Biochemistry (Moscow)*, 77(8), 843.

dependientes de PQQ; alcohol deshidrogenasa (PQQ-ADH) y aldehído deshidrogenasa (PQQ-ALDH)¹¹.

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 membrana¹²



Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) dependientes de PQQ se encuentran solamente en la fracción periplásmica de un amplio rango de especies de bacterias como; α , β y γ proteobacterias. Algunas de estas enzimas son solubles en el periplasma y otras se unen a la superficie de la membrana citoplasmática. Las ADHs quinoproteínas y quinhemo proteínas deshidrogenasas forman por así llamarlo “El sistema oxidativo de alcoholes en el periplasma”. Todas ellas funcionan como deshidrogenasas primarias, las cuales transfieren los equivalentes reducidos directamente a la cadena respiratoria bacteriana aeróbica en el periplasma.

Las ADHs dependientes de PQQ forman uno de los grupos más grandes en la familia de quinoproteínas, con 18 diferentes enzimas¹³ y se clasifican en tres tipos.

- Las PQQ-ADH *tipo I*; son similares a la metanol deshidrogenasa de metilótrofos y contienen sólo un PQQ como único grupo prostético. Generalmente se encuentran

¹¹ Matsushita K., Toyama H., Adachi O. (2004). Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respiration de *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of prokaryotic respiratory systems*. Ed. Springer. pp 81-99.

¹² Mamlouk D., Gullo M. (2013). Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*. 53, pp 377-384.

¹³ Anthony, C., and Zatman, L. J. (1967) The microbial oxidation of methanol: the prostetic group of alcohol deshydrogenase of *Pseudomonas*. *Biochemistry*. 304, pp 665-674.

solubilizadas en el periplasma. Las principales ADH de tipo I han sido aisladas de *Pseudomonas*¹⁴ y *Stenotrophomonas*¹⁵.

- Las PQQ-ADH *tipo II*; son enzimas solubles, contienen además del PQQ un citocromo tipo c. Se encuentran principalmente en *Pseudomonas*¹⁶, *Ralstonia*¹⁷ y *Comamonas*¹⁸
- Las PQQ-ADH *tipo III*; están unidas a membrana y trabajan en la superficie periplásmica y son características de las bacterias ácido acéticas^{19,20}.

Tabla 1.1. Diferencias entre los tipos de PQQ-ADH.

PQQ-ADH	Masa Molecular	Subunidades	Componentes
Tipo I	60 – 665 KDa	Una	PQQ
Tipo II	70 – 75 KDa	Una	PQQ Y 1 grupo hemo tipo c
Tipo III	150 KDa	Dos o tres	PQQ, 4 grupos hemo tipo c y un clúster [2Fe – 2S]

¹⁴Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M., Adachi, O., J. Bacteriol.(1995). Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *Journal of Bacteriology*. 177(9), pp 2442–2450.

¹⁵Tachibana, S., Kuba, N., Kawai, F., Duine, J.A., Yasuda, M. (2003). Involvement of a quinoprotein (PQQ-containing) alcohol dehydrogenase in the degradation of polypropylene glycols by the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiology Letters*. pp 218-345

¹⁶Vangnai, A.S., Arp, D.J. (2001). An inducible 1-butanol dehydrogenase, a quinohaemoprotein, is involved in the oxidation of butane by *Pseudomonas butanovora*. *Microbiology*, 147 (745), pp 745–756.

¹⁷Zarnt, G., Schrader, T., Andreesen, J.R. (2001). Catalytic and Molecular Properties of the Quinohemoprotein Tetrahydrofurfuryl Alcohol Dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* Strain Bo. *Journal of Bacteriology*. 183(1954), pp 1954–1960.

¹⁸Groen, B.W., van Kleef, M.A., Duine, J.A. (1986). Quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosterone*. *Biochemistry*. 234 (611), pp 611-615.

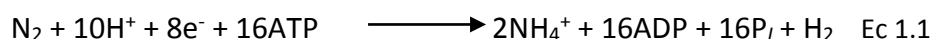
¹⁹ Toyama, H., Mathews, F.S, Adachi, O. and Matsushita, k. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function and physiology. *Archives of Biochemistry Biophysics*. 428(1), pp 10-21.

²⁰Kondo K., Horinouchi S. (1997). Characterization of the genes encoding the thre-component membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, pp 1131-1138.

1.2 Fijación de nitrógeno en bacterias ácido acéticas (BAA).

En los últimos años se ha incrementado el interés por entender los procesos involucrados en el metabolismo aeróbico, el cual debe de coexistir con la naturaleza anaeróbica de otros procesos biológicos de nitrógeno, y el probable potencial agrobiotecnológico de algunas bacterias²¹.

Aproximadamente el 80% del aire es nitrógeno molecular, N₂, y su reducción a amonio (NH₄)⁺ es el primer paso del ciclo del nitrógeno para su posterior incorporación a los aminoácidos²². Este proceso de reducción, que sólo lo pueden llevar a cabo algunas bacterias y algas, se llama fijación biológica de nitrógeno (FBN). Las nitrogenasas son las enzimas encargadas de la FBN y la reacción que catalizan (Ec. 1.1) requiere una gran cantidad de energía en forma de ATP (provenientes de la cadena respiratoria) para poder romper el enlace N≡N (942 kJ/mol)²³.



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.

La bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue la primer bacteria ácido acética reportada como fijadora de nitrógeno²⁴. A diferencia de otros diazótrofos cuyo crecimiento es anulado a valores de pH menores a 5, *Ga. diazotrophicus* logra crecer aún en condiciones ácidas (pH 3). Además, a pH óptimo es capaz de excretar cerca del 40 % del nitrógeno fijado²⁵ y en concentraciones de 10% de sacarosa, la nitrogenasa es activa y se ve favorecida aún en presencia de oxígeno, NH₄⁺ (20 mM)^{26,27} y algunos aminoácidos. A pesar de carecer de la nitrato reductasa, la fijación de nitrógeno en esta bacteria es viable aún en presencia de NO₃⁻ (25 mM)²⁸.

²¹ Hill S. (1998) How is nitrogenase regulated by Oxigen?. FEMS Microbiology Letters 54, pp 111-130.

²² Koolman, J., Rohem, K.H. (2005). *Color atlas of biochemistry*. Ed 2nd Thieme. pp 184-185

²³ Nelson, D., Cox, M.M. (1999). *Lehninger principios de bioquímica*, Ed 4^a OMEGA. PP 689-692.

²⁴ Gillis M., Kersters K., Hoste B., Janssens D., Kroppenstedt R.M., Stephan M.P., Teixeira K.R.S., Döbereiner J., De Ley J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, pp 361-364.

²⁵ Lima E., Boddey R.M., J. Döbereiner J. (1987). Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugarcane using a 15N aided nitrogen balance. *Soil Biology and Biochemistry*. 19, pp. 165-170.

²⁶ Reis M. V., Döbereiner J. (1998). Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*. 171 (13), pp 13-18.

1.3. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

La bacteria *Ga. diazotrophicus* fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner en 1988 a partir de raíces y tallos de diferente variedad de caña de azúcar cultivadas en diferentes regiones de Brasil²⁹. La bacteria fue descrita como “una nueva bacteria fijadora de nitrógeno tolerante al ácido”, y recibió el nombre inicialmente de *Saccharobacter nitrocaptans*; poco tiempo después, se le cambió el nombre a *Acetobacter nitrocaptans*. Posteriormente, con base en experimentos de hibridación RNA/DNA y DNA/DNA, recibió el nombre oficial de *Acetobacter diazotrophicus*³⁰, nombre con el cual fue reconocida por un tiempo. Sin embargo, en el grupo de trabajo de Yamada³¹, propusieron un nuevo esquema en la taxonomía de la familia *Acetobacteraceae*, y actualmente el primer fijador de nitrógeno descrito en esta familia, es referido oficialmente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Es un bacilo Gram negativo, mide entre 0.7-0.9 µm de ancho y 2 µm de longitud. Puede verse al microscopio solo o formando cadenas, tal como se muestra en la Figura 1.1³². 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 otros³³.

²⁷Stephan M.P., Oliveira M., Teixeira K.R.S., Martinez-Drets G., Döbereiner J. (1991). Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*. 77, pp 67-72.

²⁸Boddey R.M., Urquiaga S., Reis V.M., Döbereiner J. (1991). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant and Soil*. 137, pp 111-117.

²⁹Cavalcante, V. A., and J. Döbereiner. (1988). A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108, pp 23-31.

³⁰Gillis, M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. M. Kroppenstedt, M. P. Stephan, K. R. S. Teixeira, J. Döbereiner, and J. De Ley. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, pp 361-364.

³¹Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T., *Gluconacetobacter* nom. Corrig. (1998). (*Gluconacetobacter* [sci]. In Validation of publication of new names combinations previously effectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, pp 327-328.

³²Muthukumarasamy R., Revathi G. Seshadri S., Lakshminarasimhan C. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*. 83, pp 137-145.

³³Gómez S., Solano A., Saucedo J.P., Escamilla J.E., Kroneck P.M., Sosa M.E. (2010). The membrane-bound quinoxemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

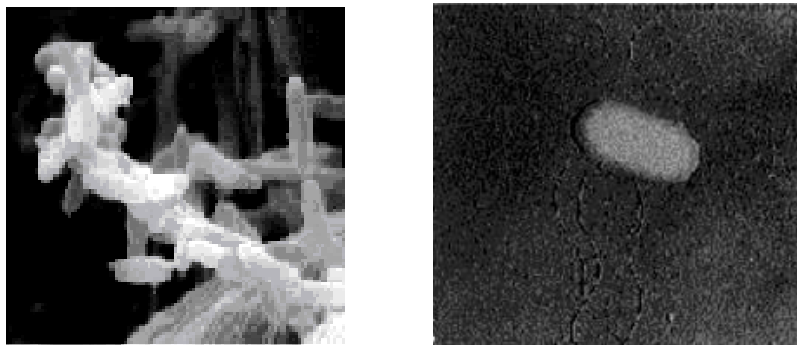


Figura 1.1. Micrografías electrónicas de *Ga. diazotrophicus*³².

1.3.1 Metabolismo y cadena respiratoria de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Al igual que la mayoría de las bacterias ácido acéticas, *Ga. diazotrophicus* posee diversas deshidrogenasas de membrana, estas pueden ser flavoproteínas o quinoproteínas y algunas de ellas tienen grupos hemo tipo *c* o *b* como grupos prostéticos; estas deshidrogenasas transfieren los electrones, producto de la oxidación de sus respectivos sustratos. 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 ubiquinona (UQ₁₀), asegurando el flujo de electrones para la síntesis de ATP requerido y el consumo de oxígeno³⁴. La UQ₁₀ actúa como el pozo de electrones que posteriormente serán transferidos a las oxidasas terminales presentes. Además de las deshidrogenasas y la UQ₁₀ existen como acarreadores de electrones grupos hemo tipo *a* y *b*, que forman parte de las oxidasas terminales³⁵.

Los complejos PQQ-ADH y PQQ-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

³⁴ Flores M., Contreras M., Soto L., Aguilar G.R., Baca B.E., Escamilla J.E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *American Society for Microbiology*. 181 (22), pp 6987-6995.

³⁵ Gónzales B., Martínez S., Chávez J. L., Lee S., Castro N. A., Domínguez M. A., Gómez S., Contreras M. A., Kennedy C. and Escamilla J. E. (2006), Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Evidence for Cyanide-Sensitive Cytochrome bb and Cyanide-resistant Cytochrome ba Quinol Oxidase. *Bioquímica et Biophysica Acta*. 1757 (12), pp 1614-1622.

fuerza motriz de protones, necesarios para la producción de energía a través de una ATPasa unida a la membrana^{36,37}.

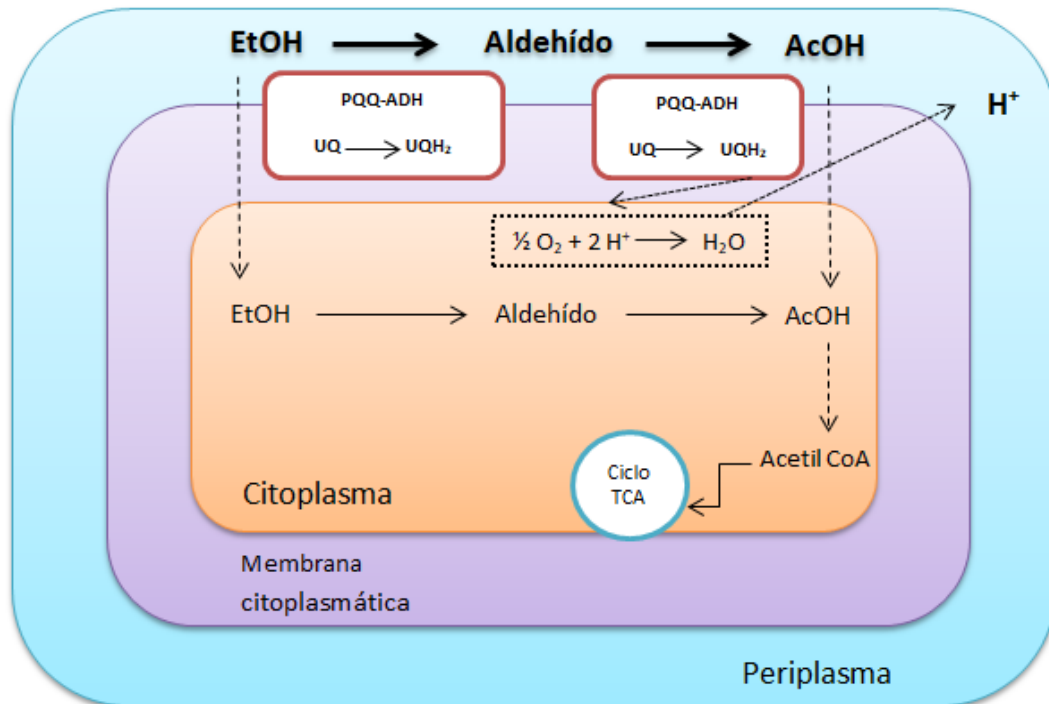


Figura 1.2 Oxidación de alcoholes en la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*³⁶.

1.4 La PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*.

La PQQ-ADH es una quinohemoproteína periplásmica responsable de la catálisis del primer paso de la oxidación del etanol y de transferir los electrones a la Q₁₀, para generar acetaldehído, el cual es usado como el sustrato de la enzima PQQ-ALDH para posteriormente generar el ácido acético como producto final de la fermentación del etanol³⁸.

³⁶Matsushita K., Toyama H., Adachi O. (2004). Respiratory chains in acetic acid bacteria: Membrane bound periplasmic sugar and alcohol respiration de *Respiration in Archaea and Bacteria. Diversity of prokaryotic respiratory systems*.Ed. Springer. pp 81-99.

³⁷ Mamlouk D., Gullo M. (2013). Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation,,» *Indian Journal of Microbiology*. 53, pp. 377-384.

³⁸ Gómez S., Solano A., Saucedo J.P., Escamilla J.E., Kroneck P.M., Sosa M.E. (2010). The membrane-bound quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

La actividad enzimática de la PQQ-ADH depende directamente del intervalo de pH en el que crece la bacteria *Ga. diazotrophicus*; en trabajos anteriores los resultados fueron un perfil simétrico donde nos indica un pH óptimo de 6 (Figura 1.3)³⁸. El punto isoeléctrico (pI) obtenido experimentalmente fue 6.1, siendo menos ácido que el reportado para otras ADH de distintas bacterias ácido acéticas³⁸.

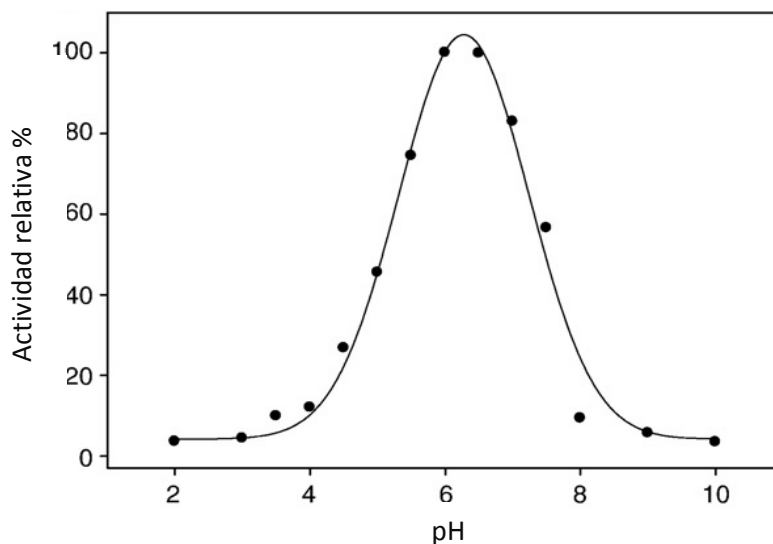


Figura 1.3 Dependencia con el pH de la actividad de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* con etanol-ferricianuro reductasa³⁸.

1.4.1 Cofactores en la PQQ-ADH de la *Ga. diazotrophicus*.

La PQQ-ADH de la *Ga. diazotrophicus* está constituida de dos subunidades: SUI (72 kDa) y la SUII (44 kDa), las cuales están constituidas de tres grupos prostéticos que llevan a cabo la transferencia electrónica en la oxidación de etanol efectuada por la bacteria *Ga. diazotrophicus*: el grupo pirroloquinolina quinona (PQQ), cúmulo [2Fe-2S] tipo ferredoxina y grupos hemo tipo c³⁸.

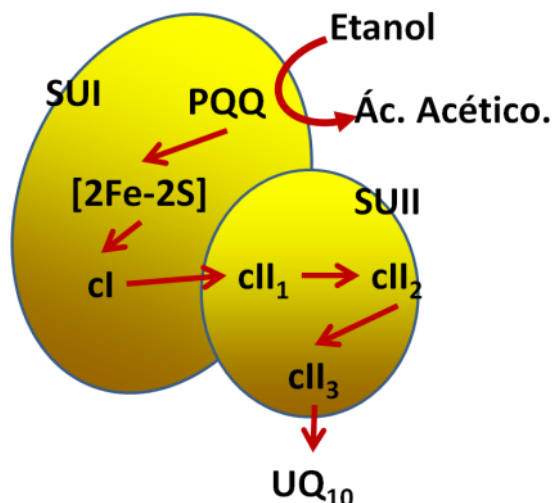


Figura 1.4 Mecanismo propuesto para la transferencia de electrones en la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* durante la oxidación de etanol. Se asignan el PQQ, cúmulo [2Fe-2S] y el hemo cl para la SUI, mientras que los hemos cll₁, cll₂ y cll₃ se asignan a la SUII³⁸.

1.4.1.1 Pirroloquinolina quinona (PQQ)

Anthony y Zantman, (1967) reportaron por primera vez el grupo prostético PQQ³⁹ al caracterizar la enzima metanol deshidrogenasa. La enzima resultó ser no dependiente de NAD(P) y poseía un espectro de absorción muy diferente al de las flavoproteínas. Después de desnaturalizar la proteína, se encontró un compuesto de baja masa molecular que presentó un espectro de emisión de fluorescencia similar al de las pteridinas. Posteriormente, se observó que la estructura del PQQ* es una orto-quinona (o-quinona) que contiene 2N's y 3H's, uno de los cuales es intercambiable; y que las posiciones C4 y C5 del anillo de la quinona, se reduce a semiquinona y a quinol durante la catálisis (PQQH* y PQQH₂) (Figura 1.5). El carbonilo C5 en la forma oxidada es muy reactivo a nucleófilos como alcoholes, amonio, cianuro y aminoácidos; y esta reactividad debe de ser tomada en cuenta cuando se quiere determinar el mecanismo de acción de la enzima⁴⁰.

*El uso del nombre sistemático (2,7,9-tricarboxi-1H-pirrol(2,3-f)quinolina-4,5-diona) es impráctico y se introdujo el nombre semi-sistemático nombrándolo como pirrolo-quinolina-quinona y abreviado como PQQ.

⁴⁰ Anthony, C., and Zantman, L. J. (1967) The microbial oxidation of methanol: the prostetic group of alcohol deshydrogenase of *Pseudomonas*. *Biochem. J.* 304: 665-674.

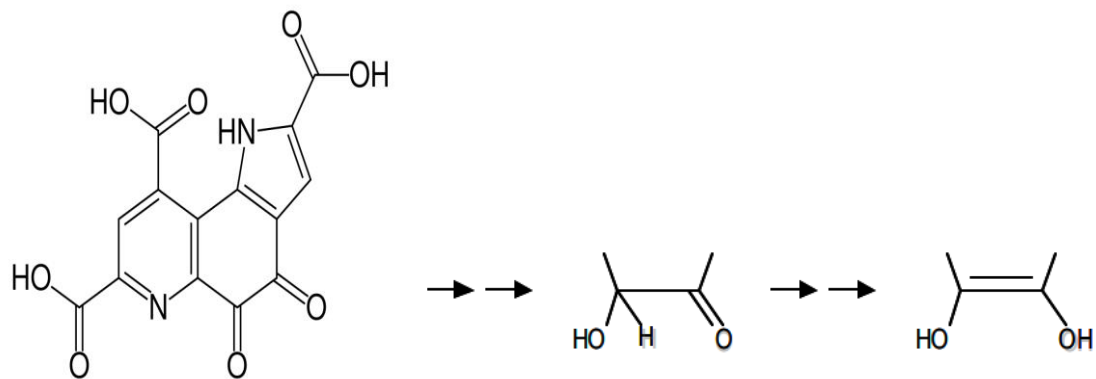


Figura 1.5. Estructura de PQQ, PQQH⁺ y PQQH₂.

Las PQQ-deshidrogenasas pueden ser monoméricas o multiméricas, pudiendo contener hemo como un segundo grupo prostético (quinohemoproteínas)⁴¹, 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)⁴².

El espectro típico de UV-vis de las quinohemoproteínas dependientes de PQQ posee bandas de absorción características entre 300 y 420 nm, estos valores se ven afectados por el entorno molecular y no es conveniente emplearlos para la identificación definitiva del grupo prostético³⁹.

1.4.1.2. Cúmulos [2Fe-2S]

Los cúmulos de Fe-S se encuentran entre los primeros catalizadores que existieron en la naturaleza⁴³. Las proteínas de Fe-S se encuentran en prácticamente todos los seres vivos y juegan un papel importante en procesos cruciales como la respiración o la fotosíntesis. Los cúmulos Fe-S con diferentes núcleos se encuentran en el sitio activo de un gran número de metaloproteínas, fueron detectados por primera vez mediante la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica en la década de los 60's al observar en estudios de RPE una señal en $g = 1.9$ que no se había observado anteriormente para ninguna metaloproteína. Los cúmulos Fe-S pueden

⁴¹Toyama H., Mathews Scott F., Adachi O., Matsushita K. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 428, 10-21.

⁴²C. Anthony. (2001). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) and quinoprotein enzymes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 3 (5), pp 757-774.

⁴³Huber, C., Wächtershäuser, G. (2006). A-Hidroxy and α -Amino acids under possible hadean, volcanic origin of life conditions. *Science*. pp 314, 630

desarrollar distintas funciones como transportadores de electrones, reducción de enlaces disulfuro, estabilización de radicales en reacciones en cadena, como sensores de estrés oxidativo o como elementos estructurales de las proteínas.

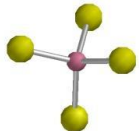

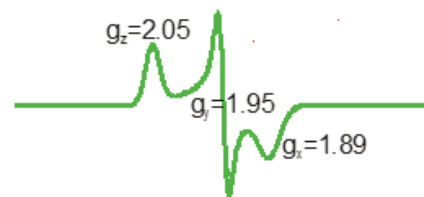
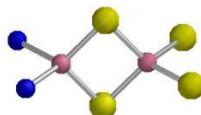
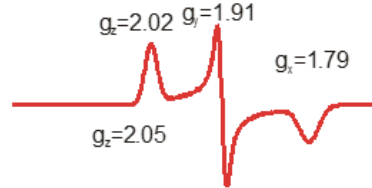
Las proteínas hierro-azufre constituyen una de las clases más grandes de proteínas no hemo, generalmente poseen una geometría tetraédrica, encontrándose comúnmente coordinados a sulfuros provenientes de residuos de cisteína o tioles, aunque también se ha observado la presencia de otros residuos. Los cúmulos 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]). En la Tabla 1.2 se muestran algunas características químicas de los cúmulos [Fe-S].⁴⁴

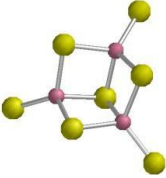
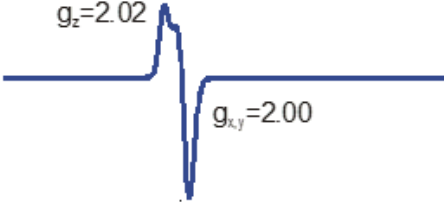
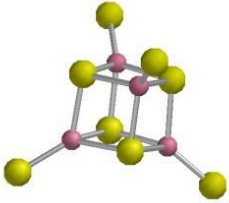
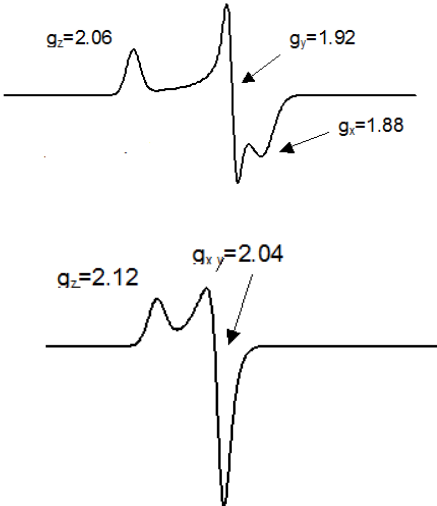
Todas las ferredoxinas [2Fe-2S] poseen un espectro de UV-vis muy similar, con bandas en 280 nm y 320 nm, además absorciones en la región del visible en 420 y 460 nm. En su forma oxidada presenta un hombro en 560 nm. Otra característica usual es que, tienen bajos potenciales de reducción, entre -460 mV y -300 mV, dependiendo del tipo de cúmulo, estructura de proteína, enlaces de hidrógeno, solubilidad y ligantes coordinados al hierro⁴⁵.

⁴⁴ Liu, J., Chakraborty, S., Hosseinzadeh, P., Yu, Y., Tian, S., Petrik, I., Bhagi, A., Lu, Y. (2014). A new introduction to molecular structure and function. *Chemical Reviews*. 114, pp 262-266.

⁴⁵ Fukuyama K. (2004). Structure and function of plant-type ferredoxins. *Photosynth Res*. 81 (3), pp 289-301.

Tabla 1.2. Cúmulos Fe-S⁴³

Cúmulo	Clase	Estructura	Estados redox	Transición	Espín total	
Fe	Rubredoxina		Fe ^{2+/3+}	Fe ²⁺ Fe ³⁺	2 5/2	
2Fe-2S	Ferredoxina		[2Fe-2S] ^{1+/2+}	2Fe ³⁺ Fe ³⁺ Fe ²⁺	0 1/2	<p>red g_{av} = 1.96</p> 
	Rieske		[2Fe-2S] ^{1+/2+}	2Fe ³⁺ Fe ³⁺ Fe ²⁺	0 1/2	<p>red g_{av} = 1.91</p> 

3Fe-4S	Ferredoxina		[3Fe-4S] ^{1+/2+}	2Fe ^{2.5+} Fe ³⁺ 3Fe ³⁺	2 1/2	ox g _{av} = 2.01 
4Fe-4S	Ferredoxina HiPIP		[4Fe-4S] ^{1+/2+} [4Fe-4S] ^{2+/3+}	4Fe ^{2.5+} 2Fe ^{2.5+} 2Fe ^{2.5+} 4Fe ^{2.5+} 2Fe ^{2.5+} 2Fe ³⁺	0 1/2 0 1/2	red g _{av} = 1.96 ox g _{av} = 2.06 

1.4.1.3. Grupos hemo tipo c

Los grupos hemo tipo c fueron descubiertos en 1883 por MacMunn a partir de 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. Actualmente, se han descubierto más de 70,000 citocromos diferentes⁴⁶.

Los citocromos son proteínas que se caracterizan por la presencia de un grupo prostético hemo que contiene hierro. Debido a este grupo hemo estas proteínas tienen una intensa capacidad de absorción de luz visible⁴⁷. Están incorporados en la membrana celular de las bacterias y en las membranas internas de las mitocondrias y de los cloroplastos. Durante la respiración y la fotosíntesis, los citocromos aceptan y liberan electrones, que pasan de uno a otro en una cadena llamada transferencia de electrones⁴⁸.

Cada grupo prostético que conforman los citocromos están formados por cuatro anillos penta-atómicos nitrogenados en una estructura cíclica, llamada porfirina (Figura 1.6). Los cuatro átomos de nitrógeno están coordinados con un ion de hierro (Fe) central, que puede ser Fe(II) o Fe(III). La hemoprotoporfirina IX se encuentra en los citocromos, como también en la hemoglobina y mioglobina. Este anillo de la porfirina posee un sistema de dobles enlaces conjugados (Figura 1), lo que explica la absorción de luz visible por estos hemos.

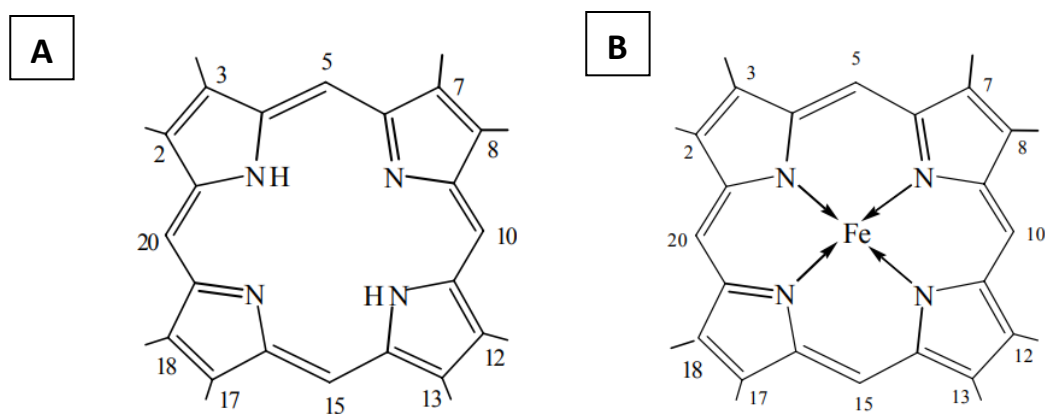


Figura 1.6. A) Anillo de porfirina, B) anillo de hierro porfirina. La numeración de los sustituyentes

⁴⁶ Keilin D. (1925). On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast and higher plants. *Proceedings of the Royal Society of London*. 98, 312-339.

⁴⁷ Liu J., Chararaborty S., Hosseinzadeh Y., Tian S., Petrik I., Bhangi A., Lu Y. (2014). Metalloproteins containing cytochrome, iron sulfur or copper redox centers. *Chemical Reviews*. 114, pp 4366-4369.

⁴⁸ Pettiegrew G. W. and Moore G. R. (1987). Cytochrome c: Biological aspects. Ed. *Springer-Verlag*. 113-229.

corresponde al convenio de la IUPAC-IUB (1988).

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(ii) a Fe(III), durante su actividad.

De acuerdo a la naturaleza del grupo hemo que contengan los citocromos se pueden clasificar en hemos de tipo *a*, *b*, y *c*. Los espectros de absorción de las metaloporfirinas se caracterizan por la presencia de tres bandas, α , β y γ que aparecen de mayores a menores longitudes de onda respectivamente. La banda γ es con frecuencia denominada banda de Soret esta representa el estado de energía más alto de la proteína⁴⁹.

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 nm⁵⁰.

A continuación, se describen los hemo tipo *a*, *b* y *c*:

- **Citocromos tipo *a*:** Además de dos cadenas de ácido propiónico en las posiciones 13 y 17, que contienen las cuatro grandes clases de hemo, la porfirina contiene una cadena lateral de formilo en posición 3. En el espectro de UV-visible se observa la banda α en 587 nm y la banda Soret en 430 nm.

⁴⁹ Slater, E.C. (1987). The mechanism of the conservation of energy of biological oxidation. *European Journal Biochemistry*. 166, pp 489-504.

⁵⁰ Walker A. (2004). Models of the Bis-Histidine-Ligated electron transferring cytochrome. Comparative geometric and electronic structure of low spin ferro and ferrihemes. *Chemical Reviews*. 104, 584-615.

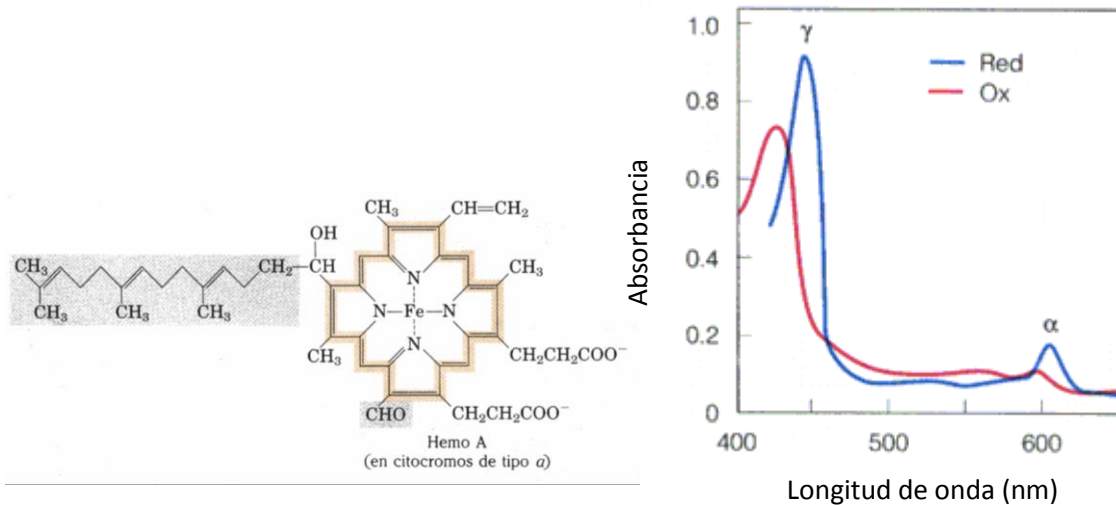


Figura 1.7. Estructura y espectro de UV-visible del citocromo tipo *a*.

- **Citocromo tipo *b*:** Los citocromos tipo *b* poseen grupos vinilo en las posiciones 2 y 4. En el espectro de UV-visible se observa la banda α en 557 nm, la banda β en 524 nm y la banda Soret en 418 nm.

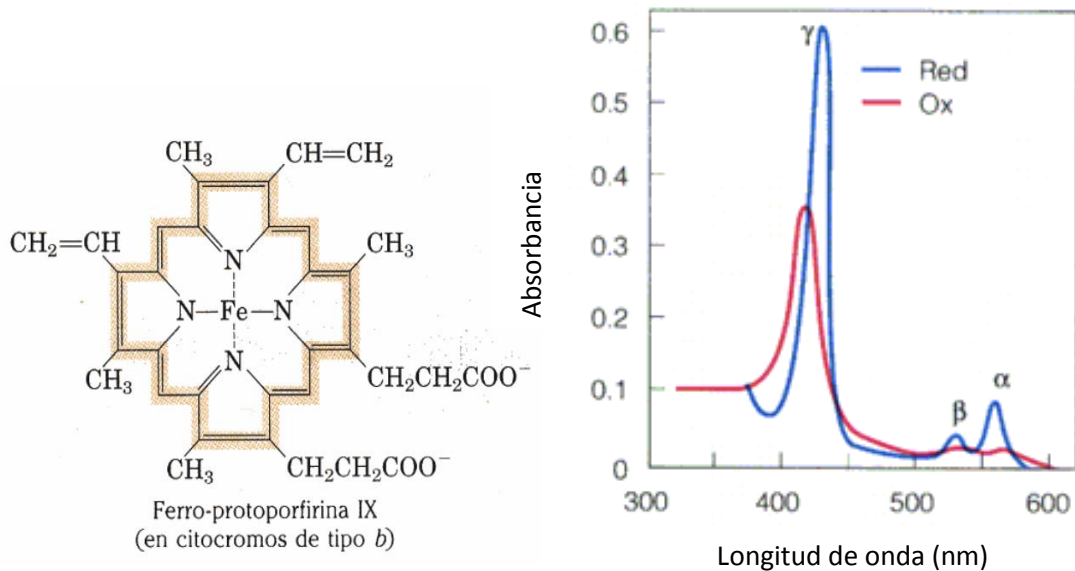


Figura 1.8. Estructura y espectro de UV-visible del citocromo tipo *b*.

- **Citocromo tipo *c*:** El citocromo *c* es una proteína pequeña de 13,0 kDa, monomérica, ya que presenta una sola cadena polipeptídica de 104 aminoácidos. Está unido de forma covalente a la proteína por un puente tioéster entre el anillo de porfirina y dos residuos de cisteína en las posiciones 14 y 17 de la cadena

polipeptídica. Este grupo hemo está rodeado por residuos hidrofóbicos y se encuentra hexa-coordinado, siendo los residuos de histidina en la posición 18 de la cadena polipeptídica (His18) y la metionina en la posición 80 (Met80) la quinta y sexta posición de coordinación, respectivamente. En el espectro de UV-visible se observa la banda α en 550 nm, la banda β en 524 nm y la banda Soret en 417 nm.

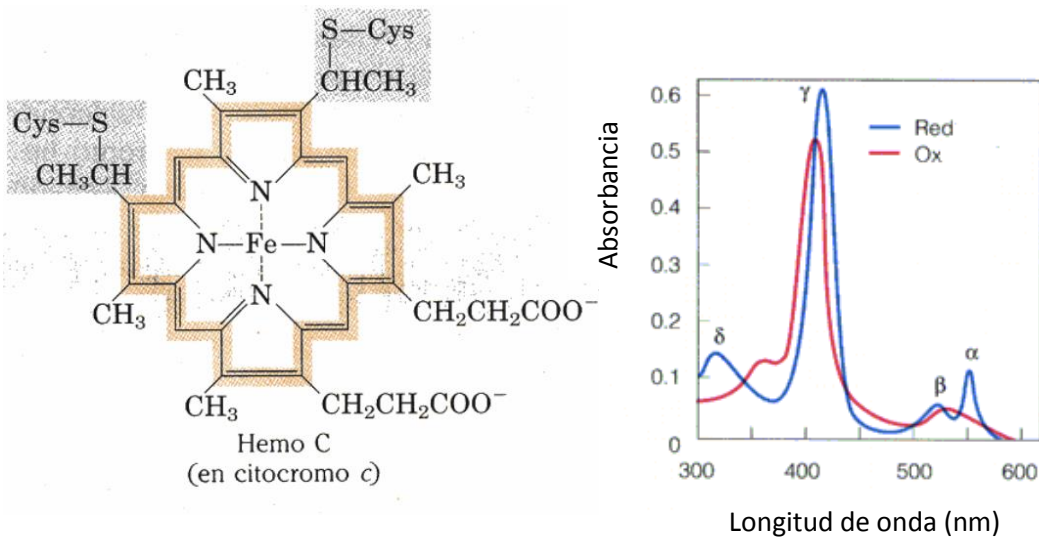


Figura 1.9. Estructura y espectro de UV-visible del citocromo tipo c.

El potencial de reducción estándar, que es la capacidad de aceptar electrones, es diferente en cada citocromo, y el valor de cada uno es lo que determina el flujo de electrones en la cadena respiratoria⁵¹ (Tabla 1.3).

⁵¹ Nelson D. L, Cox M. M. (2006). Lehninger Principios de Bioquímica. Ed. 4a Barcelona: Omega. pp 157-172.

Tabla 1.3. Potenciales de reducción estándar de los transportadores de la cadena respiratoria y otras vías metabólicas⁵¹.

Forma Reducida	Forma Oxidada	E°'(Volt)
NADH + H ⁺	NAD ⁺	-0.32
FADH ₂	FAD	-0.05
Citocromo c Fe(II)	Citocromo c Fe(III)	+0.25
Citocromo b Fe(II)	Citocromo b Fe(III)	+0.07
Citocromo a Fe(II)	Citocromo a Fe(III)	+0.29
H ₂ O	O ₂	+0.82

1.4.2. Principios de RPE.

La Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) es una técnica espectroscópica muy similar conceptualmente a la resonancia magnética nuclear (RMN), ambas basadas en la interacción de radiación electromagnética con momentos magnéticos de la materia, en el caso de RPE el momento magnético surge de electrones desapareados, motivo por el cual esta técnica se utiliza principalmente en la detección y caracterización de sustancias, compuestos y/o materiales que tengan centros paramagnéticos tales como radicales libres⁵², complejos de coordinación de metales de transición, compuestos de lantánidos y centros de color entre otros⁵³.

La RPE da una descripción del ambiente magnético local que sienten los electrones en tales sistemas paramagnéticos.

Además, permite conocer los niveles energéticos que guardan cada uno de los orbitales moleculares al ser influenciados por el campo ligante del compuesto. Desde el descubrimiento del

⁵² Solano-Peralta A-. Sosa-Torres M. E. (2000). Aplicación de un modelo para la interpretación de espectros de resonancia paramagnética electrónica de sistemas octaédricos de Cr(III). *Revista de la Sociedad de Química de México*. 44(2), pp 168-175.

⁵³ Abragam, A.; Bleaney, B. (1970). *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, *British Science Association Oxford*. pp 124-230.

fenómeno de RPE por Zavoisky⁵⁴ en 1945, éste se empezó a aplicar a sistemas paramagnéticos de metales de transición como Fe(III), Mn(II), Cu(II), etc., principalmente en forma de sales, permitiendo el desarrollo de la teoría.

La forma teórica para interpretar dichos espectros es mediante el cálculo de las energías, funciones propias y probabilidades de transiciones dadas en el Hamiltoniano de espín. Tales soluciones se obtienen típicamente mediante el uso de teoría de perturbaciones a segundo, tercero u orden mayor⁵⁵, de tal manera que éstas reflejan el orden de aproximación usado.

La interacción observada en RPE surge de la alineación del momento magnético electrónico relativo a un campo magnético externo (B), similar al alineamiento que sufre un imán en un campo magnético⁵⁶. La energía E del sistema está dada por:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde \vec{B} es el vector campo magnético y $\vec{\mu}$ es el vector momento magnético en la dirección del campo. Al tratar con iones de transición que poseen no solamente momentos magnéticos sino también espín electrónico, ambos $\vec{\mu}$ y S son considerados operadores cuánticos y están relacionados por:

$$\vec{\mu} = -g \cdot \beta \cdot \vec{S} \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde β es el magnetón de Bohr y g es el factor de desdoblamiento electrónico. En contraste con el caso de la mayoría de los núcleos donde la relación giromagnética g, la razón del momento angular al momento magnético, es negativa. Para los casos más simples, tales como los radicales libres y átomos de hidrógeno atrapados, g es cercano al valor del electrón libre de 2.0023 y casi isotrópico. La anisotropía, dependencia del valor con respecto a la orientación, es una característica de los espectros de RPE de los iones de metales de transición como se verá después. La energía potencial del dipolo en el campo magnético ahora es:

$$H^{\wedge} = g \cdot \beta \cdot \vec{S} \cdot \vec{B} \quad \text{Ec. 1.4}$$

⁵⁴ Hange W. (2006). EPR Spectroscopy as a probe of metalcenter in biological system. *Dalton Transactions*.37,pp 4415-4434

⁵⁵ Palmer G. (2000). Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins» de *Methods in Bioinorganic chemistry: Spectroscopy and Magnetism*, Que L., Ed., Sausalito, California., University Science Books.pp 487-623.

⁵⁶Maxie M., Roessler and Enrico Salvadori. (2018). Priciples and application of EPR spectroscopy in the chemical sciences. *Chemical Society Reviews*.47, pp 2534-2553.

donde H^{\wedge} es el Hamiltoniano, de espín dado que únicamente considera términos de espín y representa las interacciones que existen en los sistemas que contienen electrones desapareados y generalmente esta interacción Zeeman electrónica es la más importante en RPE.

Para un sistema de dos niveles, por ejemplo, uno donde el espín electrónico es $S = 1/2$, las energías obtenidas como solución de Ec. 1.4 son:

$$E_{\pm} = \pm 1/2 g \beta B \tag{Ec. 1.5}$$

Una transición ocurre cuando se cumple la condición de resonancia:

$$E_{+} - E_{-} = h\nu = g \beta B_0 \tag{Ec. 1.6}$$

en la cual h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de la onda electromagnética de trabajo. Como se muestra en la siguiente figura:

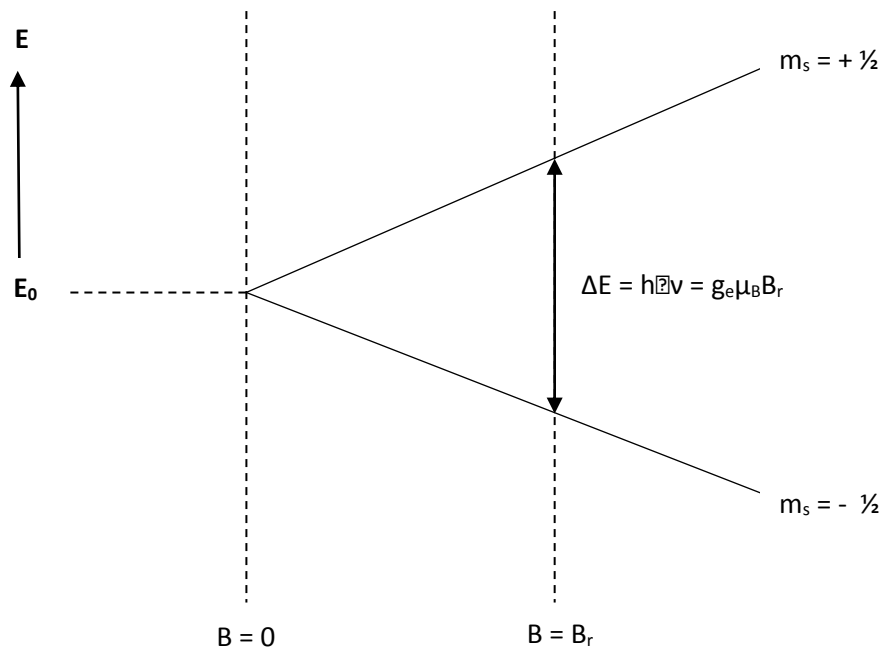


Figura 1.10. Esquema del efecto Zeeman electrónico en función del campo magnético aplicado. $E_{+1/2}$ y $E_{-1/2}$ representan las energías de los estados $M_s=+1/2$ y $M_s=-1/2$ respectivamente. B es el magnetón de Bohr y g es el factor g .

La absorción resonante se explica a continuación. A partir de la teoría de probabilidad de transición en mecánica cuántica, el cociente de una transición, en el caso de las transiciones inducidas ($1/2 \rightarrow 1/2$) y ($-1/2 \rightarrow 1/2$), se puede calcular. Es el mismo para ambas y requiere que la muestra se coloque en un campo magnético B, a ángulos rectos al campo de las microondas, B1. Las transiciones que dan lugar al espectro de RPE son de naturaleza dipolar magnética y la regla de selección para el número cuántico magnético, M_s , que tiene los valores permitidos: $S, S-1, \dots, -S$, es:

$$DM_s = \pm 1 \qquad \text{Ec. 1.7}$$

Los términos en el Hamiltoniano de espín que describen la interacción Zeeman electrónica son los mismos que para un paramagneto simple, $S = 1/2$. Sin embargo, cuando existe más de un electrón desapareado surgen otras propiedades, como en el caso de los metales de transición.

Estas propiedades dan lugar a contribuciones orbitales y efectos de campo cero. El acoplamiento espín-órbita también da lugar a grandes desdoblamientos de campo cero por el mezclado del estado basal con estados excitados. Así pues, se requiere de términos adicionales en el Hamiltoniano de espín capaces de describir el desdoblamiento de campo cero. Esto puede hacerse involucrando un término de acoplamiento mutuo entre los vectores de espín, esto es, interacciones espín-espín*.

Hasta este punto se ha tomado en cuenta únicamente el caso del electrón libre, siendo este el más simple. Sin embargo, el ambiente en el que se encuentra un electrón influye fuertemente en éste, causando anisotropía, lo que provoca un cambio en el valor de g .

Una primera consideración es la anisotropía que existe en el valor de g , es decir, que dicho valor es dependiente de la orientación de los ejes magnéticos de la molécula con respecto al campo magnético. En muchos casos, una muestra se compone de materiales policristalinos, es decir pequeños cristales orientados al azar en el espacio. El espectro resultante de RPE en polvos es el resultado de todas las orientaciones posibles de la especie paramagnética con respecto al campo magnético. El perfil del espectro está determinado por parámetros, entre ellos la simetría del tensor- g , el valor de sus componentes (g_x, g_y, g_z), así como la forma y el ancho de la curva de resonancia. Con respecto a la simetría del tensor- g se puede identificar tres casos: isotropía, axial y rómbica (Figura 1. 11)⁵⁷.

⁵⁷Palmer G. (2000). Electron Paramagnetic Resonance of Metalloproteins. Physical Methods in Bioinorganic chemistry. Spectroscopy and Magnetism. *University Science Book*. pp 532-720.

- Isotrópica, es cuando los tres valores de los componentes del tensor g son iguales ($g_x = g_y = g_z$) no tiene variación 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 otro dos componentes ($g_x = g_y \neq g_z$).
- Rómbica, ocurre cuando los valores de los componentes del tensor g son diferentes ($g_x \neq g_y \neq g_z$).

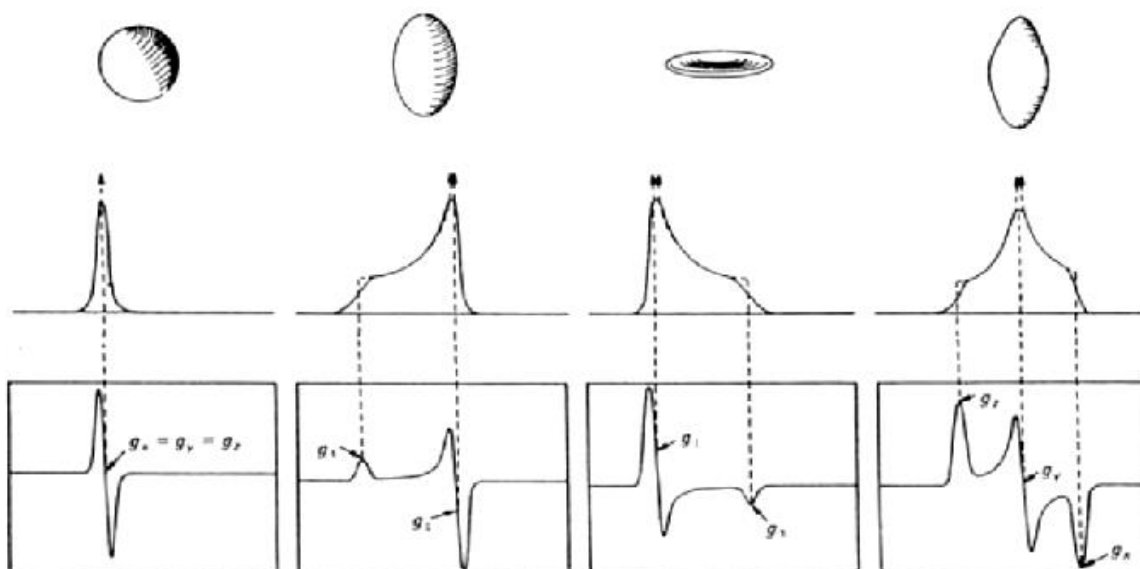


Figura 1.11. Representación esquemática de los tres tipos de espectros de RPE resultantes que se obtienen de acuerdo con la simetría y el valor de g ⁵⁸.

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

1.4.2.1. RPE de los hemos tipo c

El grupo hemo es un complejo de hierro porfínato 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

⁵⁸ Palmer G. (1985). The electron paramagnetic resonance of metalloproteins. *Biochemical Society Transactions*. 13(3), pp 4415-4434.

configuración electrónica de valencia d^6 , puede tener un espín total $S = 0$ y $S = 2$, mientras que el hierro (III), que es un ion d^5 , puede tener $S = 1/2$ y $S = 5/2$. Todos estos diferentes estados de espín se han observado (Figura 1.12).

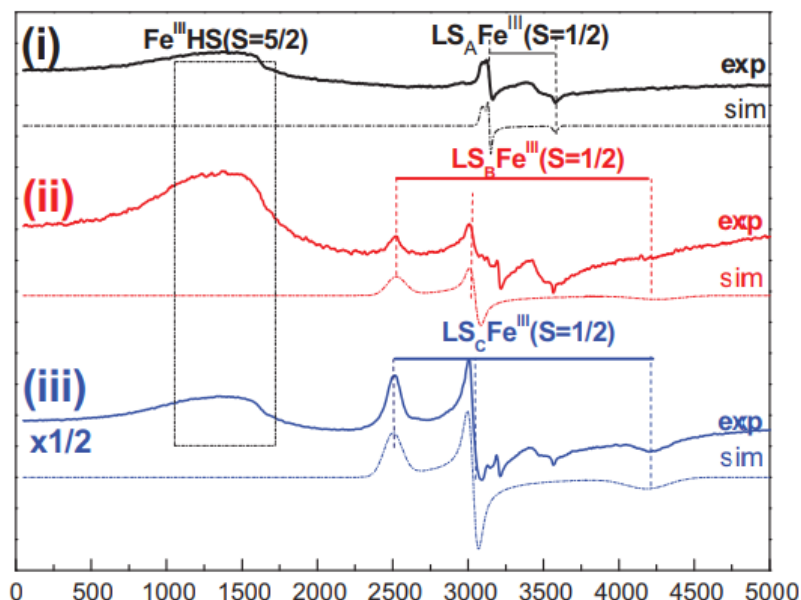


Figura 1.12. Espectro de RPE de FePc 10 M CH_2Cl_2 (i) en ausencia, (ii) en presencia de imidazol en una proporción [FePc:Imid] = 1:1 y (iii) en una proporción [FePc:Imid] = 1:10. Condiciones de RPE: Amplitud de modulación 10 Gpp, frecuencia 9.51 GHz, potencia 5 mW, frecuencia de modulación 100 kHz, Temperatura 77K. Líneas solidas: Datos experimentales. Líneas punteadas: Espectros teóricos simulados⁵⁹.

En el caso de las proteínas que cuentan en su estructura con multihemos, se han realizado estudios de RPE. En la Figura 1.13 se identifica una señal rómbica perteneciente un grupo hemo de alto espín con $g_x = 6.40$, $g_y = 6.10$ y $g_z = 4.29$, un grupo hemo altamente anisotrópico de bajo espín con $g_{max} = 3.50$ y dos señales rómbicas de bajo espín una con $g = 2.44$ y otra en $g = 2.00$ de la especie *Glossoscolex paulistus*.

⁵⁹Bletsaa E. Solakidoua M. Louloudi M and Deligiannakis Y. (2016). Oxidative catalytic evolution of redox- and spin-states of a Fe-phthalocyanine studied by EPR. *Chemical Physics Letters*. 649, pp 48-52.

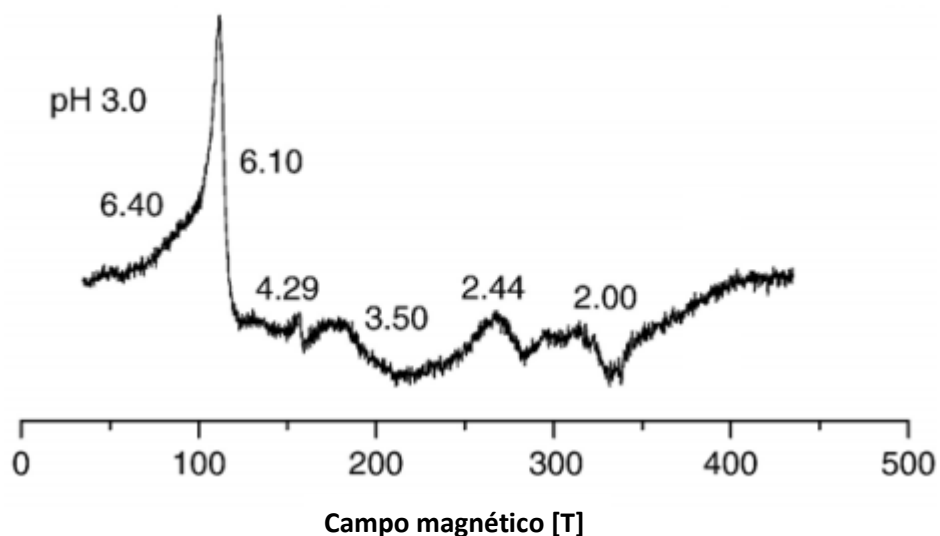


Figura 1.13. Espectro de RPE de la hemoglobina *Glossoscolex paulistus* con valores de g indicados. Condiciones: 20 mM de buffer Tris-HCl. Condiciones de RPE: $T= 12$ K, amplitud, mT; modulación de frecuencia, 100 kHz; potencia 4.0 mW; frecuencia 9.4794 GHz⁶⁰.

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

La proteína PQQ-ADH de *Ga. Diazotrophicus* ha sido estudiada y caracterizada por los grupos de Escamilla y Sosa-Torres, determinando 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. 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)⁶¹.

⁶⁰Moreira L. M. Lima Poli A. Costa-Filho A. J and Imasato H. (2006). Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. *Biophysical Chemistry*. 124, pp 62-72.

⁶¹Gómez S., Solano A., Saucedo J.P., Escamilla J.E., Kroneck P.M., Sosa M.E. (2010). The membrane-bound quinoxinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 carries a [2Fe-2S] cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

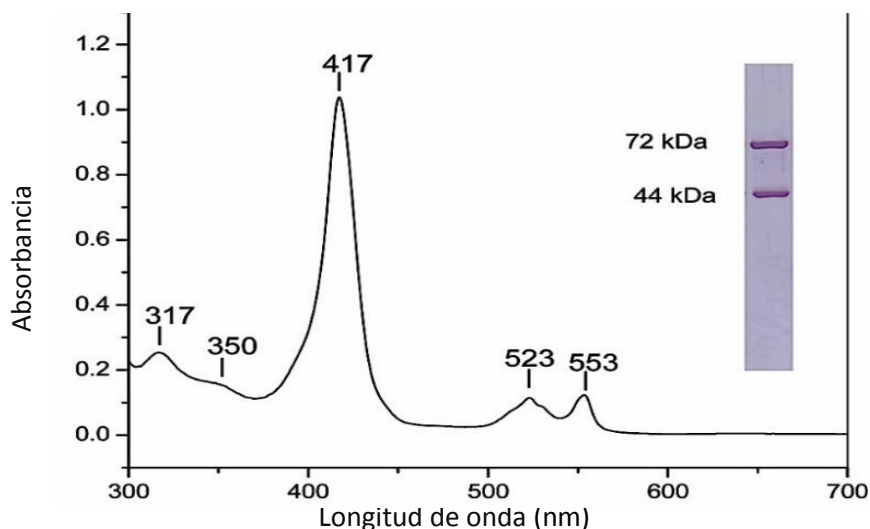


Figura 1.14 Espectro Uv-Vis de la PQQ-ADH recién aislada de *Ga. diazotrophicus*. Inserto: SDS-PAGE donde se observan la SUI (72 kDa) y la SUII (44 kDa) de la enzima⁶¹.

Por RPE se tiene documentado una señal característica de un radical orgánico, atribuida al grupo prostético PQQ en su forma de semiquinona, teniendo una señal con un valor de $g = 2.0034$ a 77 K. A bajas temperaturas (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 $g_z = 1.920$. Es de suma importancia resaltar que ambos cofactores (PQQ[•] y [2Fe-2S]) se encuentran en estado reducido, lo cual es consistente con los resultados obtenidos a partir del espectro electrónico de la proteína (Figura 1.15)⁶¹.

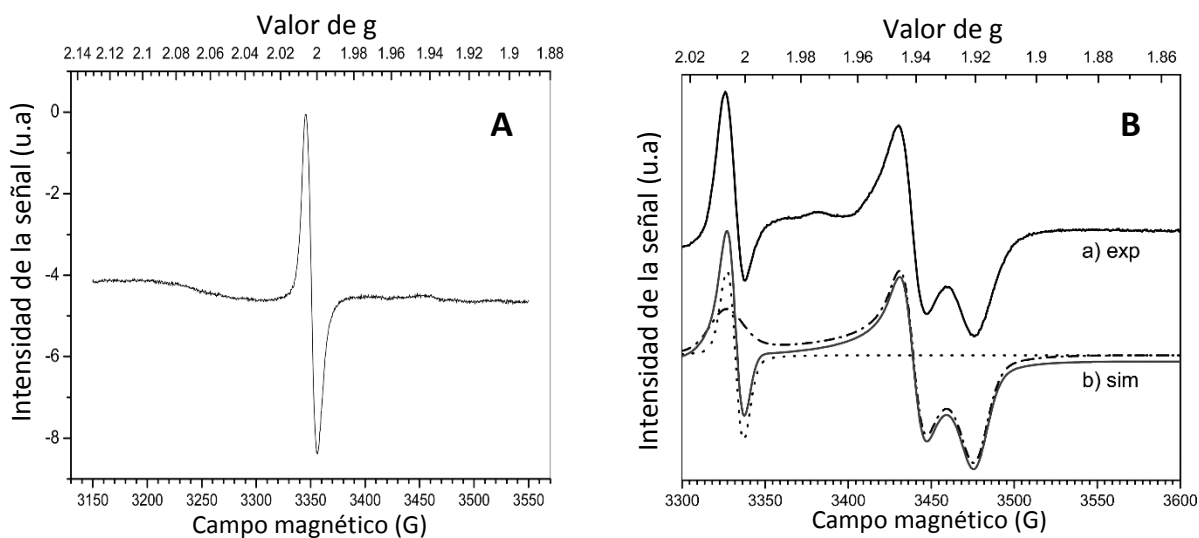


Figura 1.15. Espectros de RPE de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* recién aislada. **A)** Espectro en banda X del radical semiquinona a 77 K **B)** Espectro en banda X del cúmulo [2Fe-2S] de la PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus* a 20 K. Línea sólida: espectro experimental; Línea punteada: espectro simulado de la semiquinona PQQ; línea discontinua: espectro simulado del cúmulo [2Fe-2S]⁺⁶¹.

También han sido determinados 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 1.16 y 1.17)⁶¹.

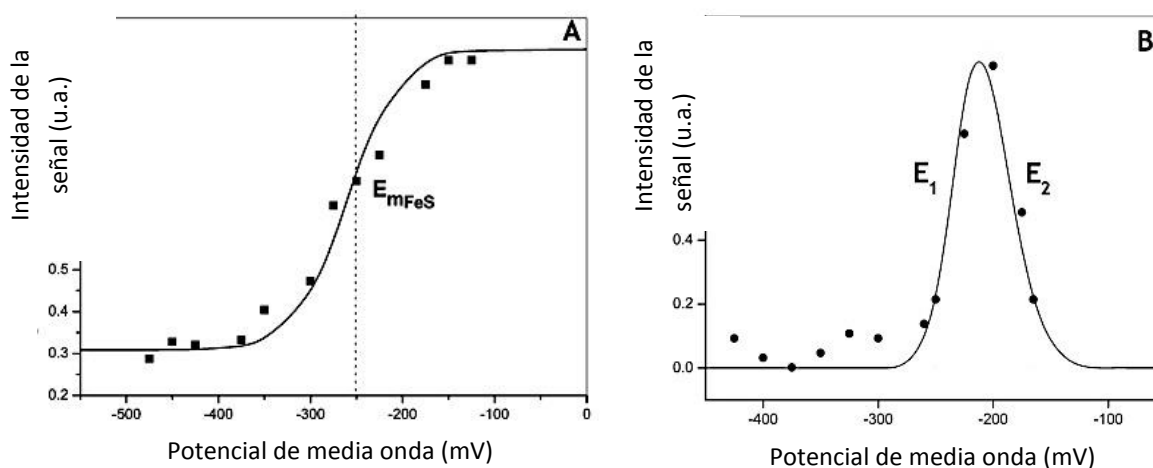


Figura 1.16. Titulación espectro-electroquímica mediante EPR de A) el cúmulo [2Fe-2S]⁺ tipo ferredoxina a 20 K y B) el PQQ[•] a 77 K⁶¹.

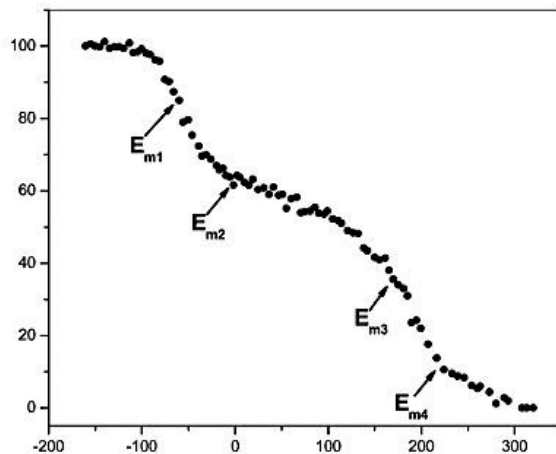


Figura 1.17. Titulación potenciométrica de los cuatro hemos tipo c dela PQQ-ADH de *Ga. diazotrophicus*. $E_{m1} = -64$ mV, $E_{m2} = -10$ mV, $E_{m3} = 170$ mV, $E_{m4} = 218$ mV⁶¹.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Estudiar los estados de espín que pueden presentar los citocromos tipo c pertenecientes a la enzima PQQ-ADH del microorganismo *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

2.2. Objetivos particulares.

Optimizar las condiciones de cultivo para obtener a la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* en su máxima expresión.

Separar mediante cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico, adsorción y exclusión molecular a la enzima PQQ-ADH.

Obtener a la enzima PQQ-ADH pura y concentrada para realizar caracterización molecular.

Analizar por espectroscopia de UV-visible la enzima reducida PQQ-ADH pura y concentrada.

Analizar por Resonancia Paramagnética Electrónica la enzima en sus formas reducida y oxidada PQQ-ADH pura y concentrada.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material biológico.

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa PAL5.

3.2. Medios de cultivo a pequeña escala.

En cada uno de los ensayos realizados en esta investigación, la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* fue crecida bajo condiciones modificadas⁶² en el medio de cultivo selectivo LGIP pH 5.5, para la preparación de 1 L se consideran las siguientes cantidades: azúcar refinada (comercial) 30g, K₂HPO₄ 5 g, KH₂PO₄ 5 g, MgCl₂ 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 2H₂O 0.02 g, NaMoO₄ 0.002 g, FeCl₃ 0.01 g, Na₂C₆H₅O₇ 2H₂O 5 g, y complementado con 20mM de (NH₄)₂SO₄.

Se colocó 1 L de medio de cultivo LGIP en matraces Fernbach con capacidad de 2.8 L para ser esterilizados en una autoclave marca Panasonic por 20 minutos a 121 °C y 15 lb/in². Finalizado el tiempo de esterilización los matraces se dejaron enfriar dentro de una campana de flujo laminar (LABCONCO), en donde se inocularon con liofilizado de la bacteria.

Ya inoculados los medios de cultivo contenidos en los matraces Fernbach se trasladaron a una incubadora marca Thermo Scientific con agitación constante de 220 r. p. m. a 30 °C. Llegadas las 36 horas de crecimiento del microorganismo (fase exponencial) se adicionaron 0.005 mL de etanol (0.5% v/v) para la sobre-expresión de la enzima PQQ-ADH. Una vez en la fase estacionaria (48 hrs) se detuvo la agitación y la incubación.

3.2.1. Tinción de Gram.

Terminado el tiempo de crecimiento de la bacteria se empleó una tinción diferencial⁶³ para visualizar la morfología y de este modo saber si se estaba trabajando con un cultivo puro.

⁶² Flores-Encarnación, M., Contreras-Zentella, M., Soto-Urzúa, L., Aguilar, G. R., Baca, B. E., Escamilla, J. E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *Journal of Bacteriology*. 181 (22), pp 6987 – 6995.

⁶³ Ramírez G. M., Luna M. B., Valázquez M. O., Viena G. L., Mejía C. A., Tsuzuki R. G., Hernández G. L., Mügggenburg I., Camacho C. A y Uzúa H. (2011). Manual de Prácticas de Microbiología General. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dentro de la campana de flujo laminar en condiciones estériles se tomó una muestra del cultivo activo con una asa bacteriológica y se realizó un frotis en un porta objetos estéril. La muestra se fijó flameando un par de veces sobre un mechero.

La tinción inició cubriendo la preparación fija con un colorante primario, cristal violeta de Gram, dejando actuar durante un minuto y moviendo suavemente el portaobjetos para favorecer el contacto del colorante con las células. Al cabo de un minuto se escurrió el exceso de colorante y se lavó con agua destilada.

El siguiente paso fue cubrir la muestra con lugol, dejando actuar por un minuto para poder lavar con agua destilada.

A continuación se decoloró la muestra con una mezcla de etanol y acetona 1:1 por unos segundos y se lavó con agua destilada para detener la acción del colorante.

Posteriormente, se cubrió la muestra con un colorante secundario, safranina, se dejó actuar por un minuto y se lavó con agua destilada.

Realizada la tinción se colocó el portaobjetos en un microscopio óptico de campo claro, y se observó con un lente de 100X con aceite de inmersión, para mejorar la calidad de la imagen.

3.2.2. Preservación de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* cepa PAL5.

Realizada la tinción de Gram y verificando la pureza del cultivo se preservó la bacteria⁶⁴, para su uso posterior.

Dentro de la campana de flujo laminar, se tomaron tubos Eppendorf estériles en los cuales se colocaron 900 µL de cultivo activo y 100 µL de glicerol, esterilizado previamente. Se agitó vigorosamente y se almacenaron a -80 °C.

⁶⁴Flores M., Contreras M., Soto L., Aguilar G.R., Baca B.E., Escamilla J.E. (1999). The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *American Society for Microbiology*. 181 (22), pp 6987-6995.

3.2.3. Obtención de la enzima PQQ-ADH.

Transcurrido el tiempo de crecimiento del microorganismo se obtuvieron las células en la fase estacionaria (48 hrs) por medio de una centrifuga modelo Beckman J2-21 M/E a 8,000 r. p. m. y lavadas con buffer de fosfato 30 mM pH=6, 30 mM de CaCl₂ y 30 mM de MgCl₂ (solución amortiguadora PCM.).

Para la obtención de las membranas, las células fueron resuspendidas en amortiguador PCM, adicionando DNAsas y fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMS-F) (15 µg/mL) como inhibidor de proteasas, posteriormente se incubaron por 2 horas a 4 °C, para ser rotas con un sonicador (SONICADOR VIBRACELL 75115 BIOBLOCK) por un periodo de 30 minutos realizando ciclos de 59 segundos de pulsación y 10 segundos de descanso. Las células que no se pudieron romper con la ayuda del sonicador, fueron separadas por centrifugación a 8,000 r. p. m. durante 15 minutos.

Las membranas fueron obtenidas por medio de una ultracentrifuga marca LB-70M ultracentrifuge Beckman a 44,000 r. p. m. por 60 minutos. Posteriormente, se resuspendieron en un buffer de fosfatos 10 mM, pH 6.0 con Tritón X-100 al 0.5 %, agitando constantemente a 4 °C por 24 horas, finalizado este tiempo, se centrifugó la mezcla a 44,000 r. p. m. por 60 minutos.

El sobrenadante obtenido, de color rojo, se utilizó para comenzar el proceso de purificación de la enzima PQQ-ADH.

3.2.4. Medios de cultivo a gran escala.

El cultivo masivo de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* se realizó en un fermentador de tipo Mobile Pilot (Fermentor BIOFLO 5000, Brunswick Scientific) con una capacidad de 300 L, iniciando con un pre- inóculo en medio de un cultivo LGIP de 30 L bajo condiciones estériles.

El cultivo creció a 30 °C, con una agitación constante a 320 r. p. m., aireación de 32 L de aire por minuto⁶⁵.

Durante el crecimiento del microorganismo, cada 3 horas se monitorearon las condiciones del fermentador. Llegada la fase exponencial (33 horas) se adicionaron 1.5 L de etanol (0.5% v/v) y

⁶⁵ Gómez Manzo Saúl. Papel de la deshidrogenasa periplásmica para etanol *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 (Doctorado). (2007). Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

se esperaron 52 horas (fase estacionaria) para poder detener la agitación y recuperar las células con una centrifuga de flujo continuo marca Sharpflex. Las células obtenidas después de la centrifugación se almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

Para hacer uso de las membranas, se tomaron 250 g de las células congeladas, las cuales se depositaron en un recipiente a 4 °C para descongelarlas y seguir con el proceso de lavado y de centrifugación descrito en la sección anterior.

3.3. Purificación de la PQQ – ADH de la *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

El sobrenadante, color rojo, en el cual se encuentra contenida la enzima PQQ-ADH, se empleó para comenzar con el proceso de purificación por cromatografía en columnas⁶⁶.

3.3.1. Cromatografía en columna.

La cromatografía en columna se realizó en columnas de vidrio vertical llenadas con resinas de intercambio iónico (QAE-Toyopearl y DEAE-Toyopearl), adsorción (Hidroxiapatita-Ultrogel) y exclusión molecular (Sephacryl S-200 y Sephacryl S-100). Para hacer uso de cada una de ellas se equilibraron con buffer de fosfatos 10 mM a pH 6, y Tritón X-100 al 0.1%.

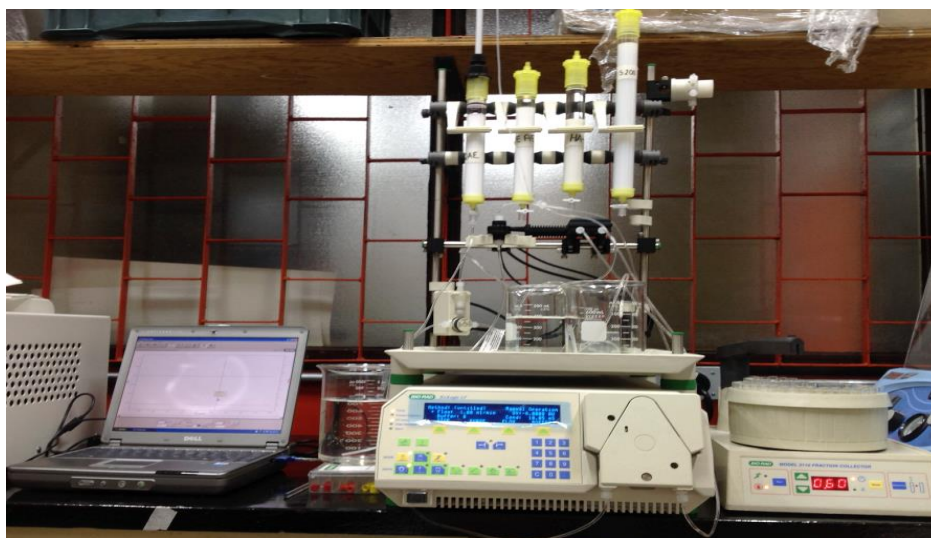


Figura 3.1. Equipo utilizado para realizar la cromatografía en columna.

⁶⁶ Matsushita, K., Takaki, E., Shinogawa, M., Ameyama, O., and Adachi. (1992). Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria. Reactivity with ubiquinone of pyrrolouinoline quinine-dependent alcohol dehydrogenase purified from *Acetobacteraceae* and *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56, pp 304-310.

3.3.1.1. Columna QAE – Toyopearl.

El sobrenadante color rojo se concentró en un Amicon D850 (Amicon Corporation, Danvers, Mass, USA) y se inyectó a la columna (30 cm. de largo por 5 cm. de ancho) que contenía una resina QAE-Toyopearl de intercambio iónico. Ya inyectada la enzima en la columna, se recuperaron las fracciones de interés con un lavado de buffer de fosfatos pH 6 a flujo constante, monitoreado mediante espectroscopia de UV-visible a $\lambda = 280$ nm, que coincidía con el color rojo de la fracción.

3.3.1.2. Columna DEAE-Toyopearl.

Las fracciones obtenidas y concentradas de la columna anterior (QAE-Toyopearl) se inyectaron a la siguiente columna (22 cm. de largo por 2.5 cm. de ancho) que contenía la resina DEAE-Toyopearl de intercambio iónico, a un flujo constante de buffer de fosfatos 10 mM a pH 6, igualmente monitoreada por espectroscopia de UV-visible ($\lambda = 280$ nm) para la obtención de las fracciones de interés que son rojas también. Se juntaron las fracciones que contienen a la PQQ-ADH y se concentraron en tubos Centricon AMICON® Ultra – 15 de 50 mL.

3.3.1.3. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel.

Continuando con el proceso de purificación, las fracciones obtenidas anteriormente se inyectaron en la siguiente columna (22 cm. de largo por 2.5 cm. de ancho) con la resina de adsorción Hidroxiapatita—Ultrogel.

Las fracciones obtenidas se recolectaron y se concentraron por filtración empleando tubos Centricon AMICON® Ultra – 4 de 15 mL

3.3.1.4. Columna Sephacryl S-100.

Para finalizar con el proceso de purificación, las fracciones obtenidas y concentradas de la columna anterior (Hidroxiapatita-Ultrogel) fueron inyectadas en la columna (120 cm. de largo por 2.5 cm. de ancho) con resina Sephacryl S-300, inyectando la enzima a un flujo constante de buffer de fosfatos 10 mM pH 6 a 0.5 mL/min, monitoreando el proceso de elución mediante espectroscopia de UV-visible, donde se recolectaron las fracciones de enzima, las cuales se concentraron por filtración empleando tubos Centricon AMICON® Ultra – 4 de 15 mL

3.4. Caracterización molecular.

3.4.1. Electroforesis (SDS-PAGE).

Una vez obtenida la última fracción que contiene a la enzima PQQ-ADH pura, ésta fue analizada con gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante⁶⁷ (SDS-PAGE), para lo cual se preparó un gel en placa vertical.

El gel concentrador se preparó con acrilamida 10%, buffer TRIS-CL pH=6.8, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, persulfato de amonio (APS) al 10%, y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) 20 µL, como iniciador de la polimerización. El gel separador se preparó con acrilamida al 10%, buffer TRIS-CL pH=8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio al 10% y TEMED 4 µL.

La muestra de ADH fue diluída en una mezcla de digestión que contenía: Buffer de 0.5 M TRIS-CL pH 6.8 2.5 mL, SDS al 10% 1 mL, glicerol 2 mL, agua destilada 10 mL, azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol 2 mL y se mantuvo un par de minutos a 95 °C, agitándola para homogeneizarla. Se inyectaron 20 µL de muestra final con ayuda de una micropipeta Hamilton en uno de los pozos del gel de electroforesis ya montado en la carcasa de plástico.

En un pozo adyacente al de la muestra de digestión se colocó un marcador de peso molecular.

Se llenaron las cámaras de la cubeta de electroforesis con un buffer de corrida que contenía: TRIS base, glicina, SDS al 10%, llevado a un volumen final de 1 L.

La cubeta de electroforesis se conectó a una fuente de flujo continuo a 120 mA por 1 hora. Una vez terminado el tiempo de corrida, se tiñó el gel con Azul de Coomassie, ácido acético y metanol por 4 horas y se destiñó con una mezcla de ácido acético y metanol durante una noche. Desteñido el gel se analizó con ayuda del marcador de pesos molecular.

⁶⁷ Cleveland, D., W. Fischer, S., G. Kirschner, M., W. and Laemmli U., K. (1977). Peptide Mapping by Limited Preteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 22(3), pp 1102-1106.

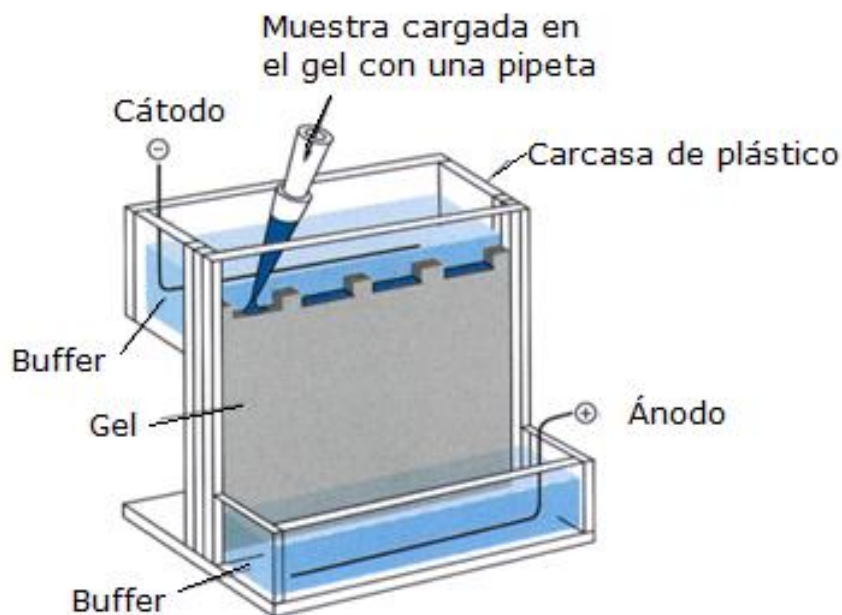


Figura 3.2. Esquema de sistema para realizar electroforesis en gel.

3.5. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry modificado, empleando albumina sérica bovina como proteína estándar⁶⁸.

3.6. Ensayo para deshidrogenasas.

El método utilizado para determinar actividad de deshidrogenasas⁶⁹ fue el de ferricianuro reductasas. Se realizó una mezcla de reacción que contenía amortiguador MacLlavaine (K_2HPO_4 y ácido cítrico), ferricianuro de potasio $K_3[Fe(CN)_6]$ 0.1 M, etanol 1M, Tritón X-100 al 10%, dupanol (SDS y $Fe_2(SO_4)_3$) y ácido fosfórico (H_3PO_4).

⁶⁸ Peterson, G., L. (1977). A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*. 83, pp 346-356.

⁶⁹ Ameyama M, Adachi O. (1982). Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membranebound. *Methods Enzymol*. 89, pp 450-457.

3.7. Caracterización espectroscópica.

3.7.1. Análisis de los grupos prostéticos PQQ y hemos tipo c por espectroscopia electrónica UV-visible.

La enzima purificada PQQ-ADH en forma reducida, se depositó en una celda de cuarzo de 1 cm. para ser analizada en un espectrofotómetro de arreglo de diodos marca Agilent 8453, utilizando buffer de fosfatos como blanco. El espectro se obtuvo de 300 a 620 nm, con el fin de identificar las bandas de absorción específicas de cada grupo prostético.

3.7.2. Análisis de los grupos prostéticos PQQ y hemos tipo c por EPR de la ADH aislada y purificada.

Los espectros de RPE se obtuvieron bajo condiciones de potencia de microondas de no-saturación, en un espectrómetro Bruker Elexys E500 a ~ 9.40 GHz (banda-X) y una modulación de 100 kHz. Los espectros fueron evaluados y simulados usando el "software" de Bruker. Los valores de g se obtuvieron midiendo los valores de campo magnético y la frecuencia de microondas utilizada. La temperatura se mantuvo constante con un criostato Oxford de flujo continuo de helio (10 – 20 K) o con Dewar de nitrógeno líquido (77 K).

Se colocaron ~ 400 μ L de enzima PQQ-ADH en un tubo de cuarzo (4 mm d.i.). La muestra se congeló sumergiendo el tubo en nitrógeno líquido. Posteriormente, el tubo se colocó dentro de la cavidad del espectrómetro cuya temperatura estaba a 10 K.

3.8.1. Análisis redox de la enzima PQQ-ADH.

El análisis se realizó con una titulación redox de la enzima PQQ-ADH a una concentración de 12 mg/mL en un ambiente anaerobio mediante un flujo de nitrógeno constante y a temperatura ambiente con $K_4[Fe(CN)_6]$ como agente oxidante.⁷⁰

Para iniciar la titulación se realizó una mezcla de quinonas, como mediadores redox a una concentración de 50 mM: la antroquinona-2-sulfonato (-225 mV), la 2-hidroxi-1-4 naftoquinona (-45 mV), la menadiona (0.0 mV), la duroquinona (50 mV), la 1,4 naftoquinona (+134 mV) y

⁷⁰ Dutton, P. L. (1976) Redox potentiometry: determination of midpoint potential of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods Enzymol.* LIV, pp 411–435.

finalmente la 1,4-benzoquinona (+285 mV)⁷¹, contenidas todas en un *buffer* de fosfatos 0.01 M a pH 6, y Tritón X-100 al 0.1%.

El potencial fue medido con un electrodo combinado Ag/AgCl – Pt, calibrado con una solución saturada de quinhidrona (+285 mV).

Se tomaron mediciones cada 5 mV adicionando pequeñas cantidades de K₄Fe(CN)₆, hasta que se observaba una constante en el valor tomándolo como punto de inflexión en el cual se separaba una alícuota de cada punto para ser analizada por EPR. Este análisis se determinó en el modo de doble longitud de onda; la oxidación de los grupos hemo se registró en la banda máxima a 553 nm con la longitud de onda de referencia, establecido a 540 nm en un espectrofotómetro OLIS-SLM DW2000.

Las mediciones resultantes se analizaron por medio de la ecuación de Nerst con cambio de un electrón con potenciales redox desconocidos con un programa amablemente proporcionado por el Dr. R. Louro (Universidade Nova de Lisboa).

Las alícuotas tomadas en los puntos de inflexión fueron congeladas con nitrógeno líquido (77 K) para poder obtener un análisis de cada una de ellas por EPR a una temperatura de 10 K.

En otro experimento, la enzima PQQ-ADH pura y concentrada (21 mg/mL) se colocó en un tubo de cuarzo, a la cual se le añadieron 100 µL de hidróperóxido de terbutilo⁷², (CH₃)₃COOH) como agente oxidante. Se mezcló y agitó durante un minuto y posteriormente se congeló en nitrógeno líquido (77K) y se ingresó a la cavidad del EPR para realizar la medición a 10 K.

Por otra parte, para finalizar con las mediciones por EPR se preparó una muestra de la enzima PQQ-ADH pura y concentrada (21mg/mL) que se había obtenido 12 meses atrás a una temperatura de 77 K en un ultracongelador, esto con el fin de saber el estado en el que se encontraba.

⁷¹ Andrade, S. L.A., Brondino, C. D., Feio, J., Moura I., M., and Moura, J. G. (2000) Aldehyde oxidoreductase activity in *Desulfovibrio alaskensis* NCIMB 13491 EPR assignment of the proximal [2Fe-2S] cluster to the Mo site. *European Journal of Biochemistry*. 267, pp 2054–2061.

⁷²Nantes, I., L. Adelaide F., Otaciro, R., N. Brandy, B. Gatti, R. Bachara, E., J., H. (2000). Modifications in hemo iron of free and vesicle bound cytochrome *c* by tert-butyl hydroperoxide: a magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(5), pp 786-789.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Medios de cultivo a pequeña escala.

El cultivo precursor se inició con un liofilizado de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, inoculado en el medio de cultivo LGIP bajo condiciones estériles. El escalamiento partió en matraces Erlenmeyer de 250 mL, utilizados como pre inóculos para medio de cultivo estéril en matraces Fernbach.

Se monitoreo el crecimiento del microorganismo *Gluconacetobacter diazotrophicus*, observando crecimiento a las 36 horas (fase exponencial) de haber sido inoculados. Al finalizar del tiempo de incubación (42 horas) en medio se observaba presencia de biomasa y con una coloración más oscura a la inicial como se observa en la Figura 4.1.

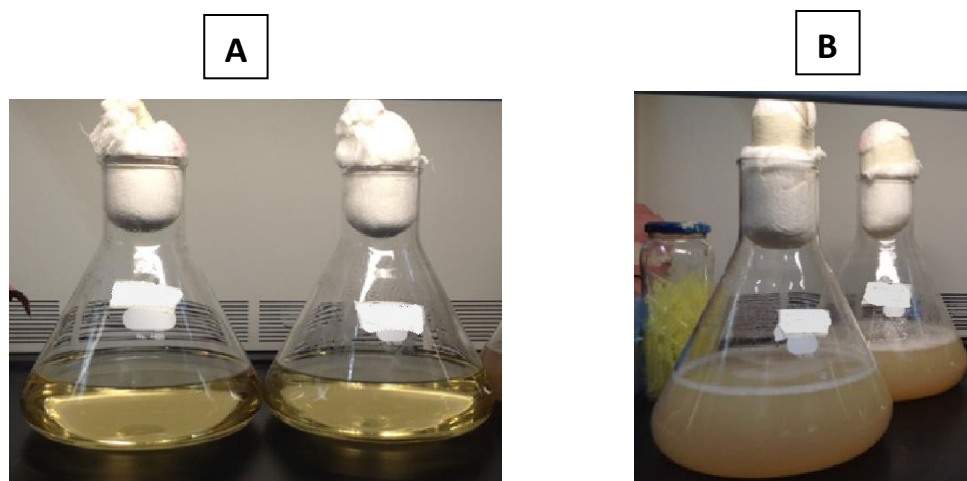


Figura 4.1. A) Medio de cultivo LGIP estéril. B) Medio de cultivo LGIP inoculado con la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* a las 42 horas de incubación.

4.1.1. Tinción de Gram.

Para cerciorarnos de la pureza de los cultivos inoculados anteriormente descritos, se realizaron tinciones de Gram.

Al observar la preparación pudimos identificar bacilos Gram negativos que son característicos por su tinción en color rojo, a diferencia de los bacilos Gram positivos. Esta coloración nos indica que la pared celular posee una capa de peptidoglucano muy delgada, a diferencia de los bacilos Gram positivos.

Se puede apreciar de igual manera un tamaño de bacilo aproximado de 0.7 – 0.9 μm . De acuerdo a la literatura⁷³ esto nos indica que el cultivo analizado esta puro.

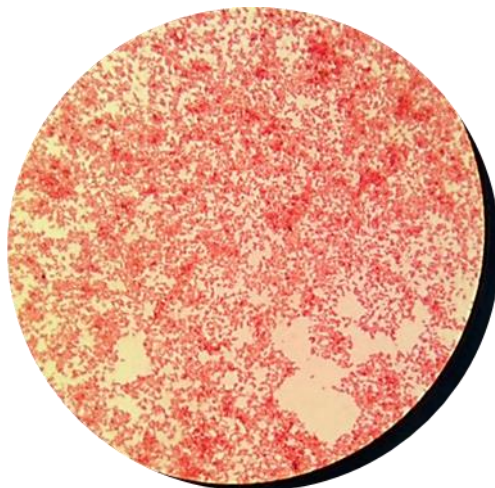


Figura 4.2. Tinción de Gram vista desde el microscopio de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

4.2. Medios de cultivo a gran escala.

Al realizar el cultivo de 300 L en un fermentador de tipo Mobile Pilot, iniciado con un pre inoculo en medio LGIP de 30 L, se pudieron monitorear distintos factores que están relacionados directamente con el crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* tales como:

4.2.1. Densidad óptica.

Se consideró la medición de absorbancia de la cantidad de luz dispersada o transmitida a través del cultivo de la bacteria a distintos tiempos.

⁷³ Gillis M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt R M, Stephan M P, Teixeira K R S, Döbereiner J and De Ley J (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39, pp 361-364.

Las suspensiones bacterianas dispersan la luz al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua. La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

Para iniciar con la curva de crecimiento de nuestro cultivo, se realizaron las mediciones a 600 nm de 0 a 58 horas, obteniendo la curva que se muestra en la Figura 4.3.

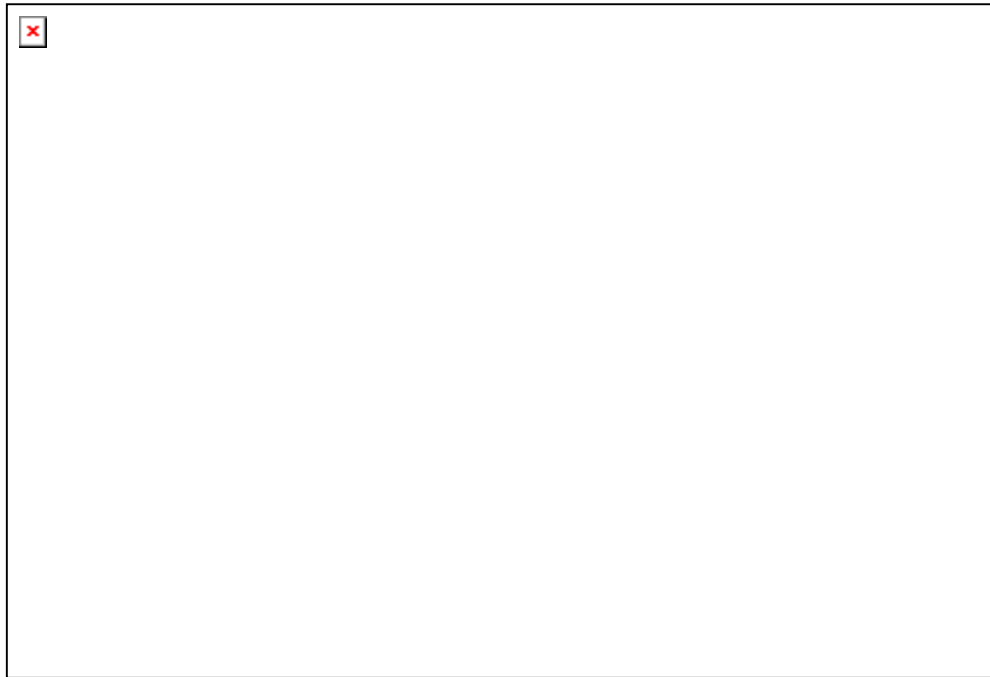


Figura 4.3. Curva de crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* de 0 a 58 horas

En esta curva de crecimiento se pueden observar en el punto A, el periodo de latencia o adaptación: en este tiempo no hay aumento significativo de la densidad celular y el crecimiento es asincrónico.

Cerca del punto B, se observa un punto de inflexión en el periodo de crecimiento exponencial, el cual es sincrónico y donde se alcanza una máxima velocidad de crecimiento.

En el punto C, se distingue el periodo de retardo disminuye el crecimiento exponencial.

Y finalmente en el punto E, se aprecia el inicio del periodo estacionario. En este caso, se detuvo la incubación al iniciar esta etapa

Para poder percatarnos de la hora en la que existe el máximo de crecimiento microbiano, se realizó la primera derivada de la curva de crecimiento.

Observando en la Figura 4.4, a las 33 horas de incubación se percibe un máximo de crecimiento, es en ese momento en el que se debe adicionar etanol al 0.5 % al medio de cultivo para obtener la mejor sobre expresión del microorganismo.

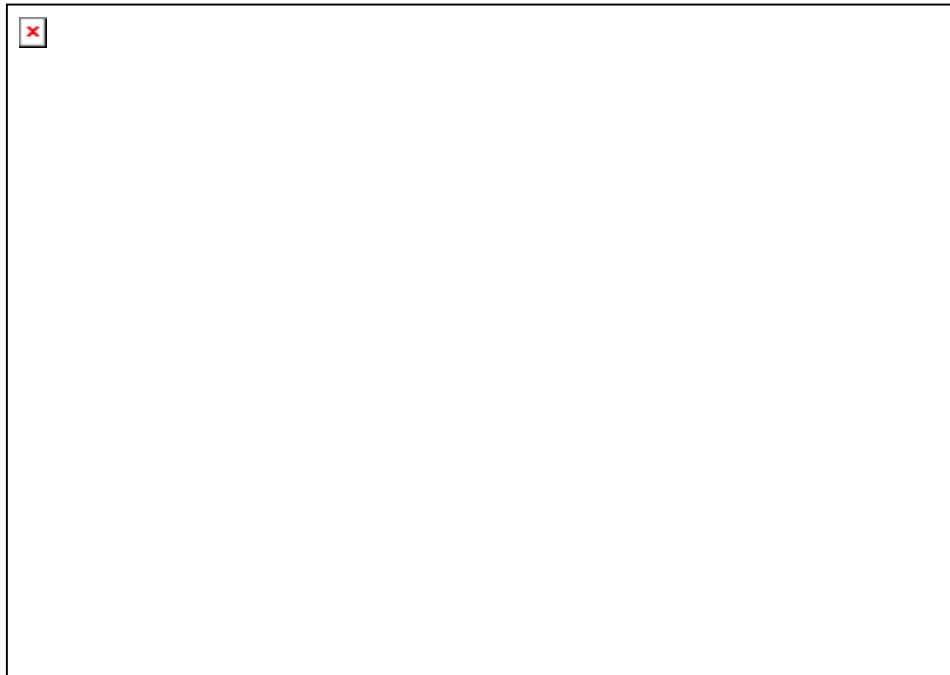


Figura 4.4. Derivada de la curva de crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* de 7 a 58 horas

4.2.2. pH

Otro factor involucrado directamente en el crecimiento de la batería es el pH.

El pH fue monitoreado dentro del biofermentador durante todo el tiempo de incubación, mostrando una disminución considerable dentro de las primeras 4 horas, esto debido a la formación de ácido acético dentro del medio.

En el presente trabajo se realizó una modificación al método ya propuesto⁷⁴, se controló el pH con hidróxido de potasio (KOH), manteniéndolo en el intervalo en donde la enzima se encuentra activa como se muestra en la Figura 4.5.

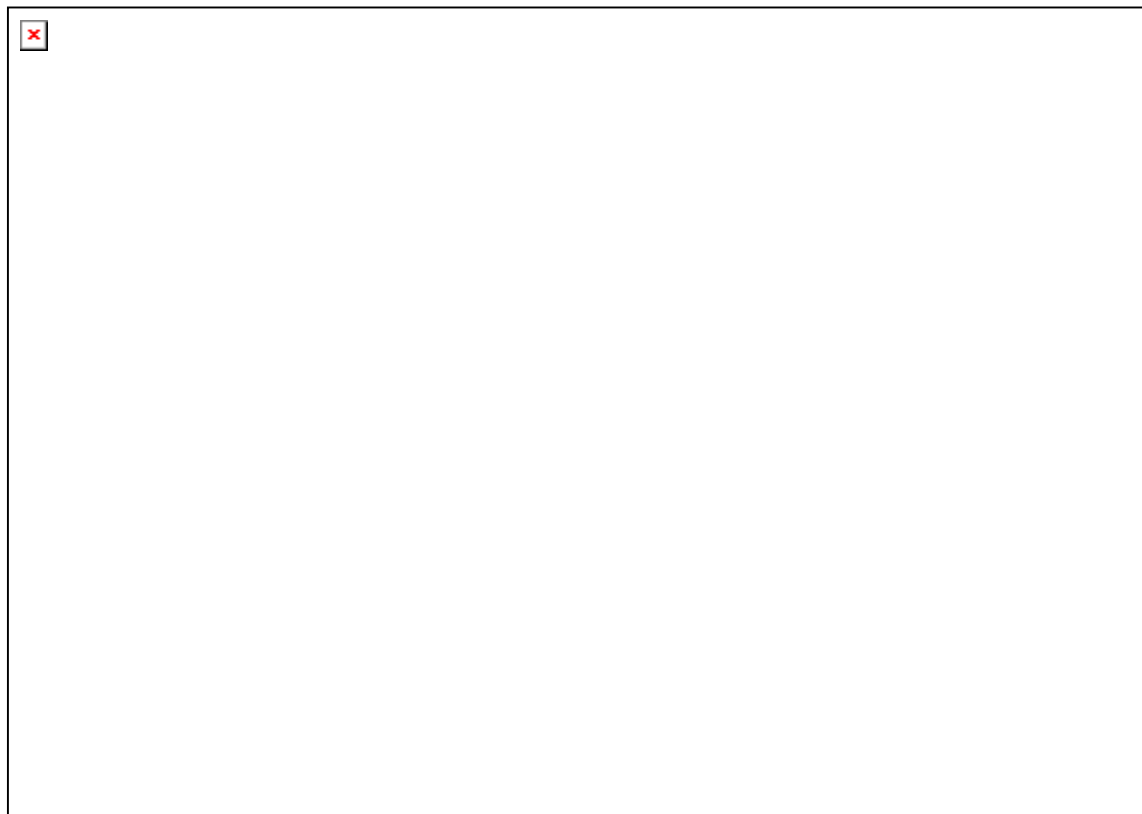


Figura 4.5. Curva de control de pH monitoreada durante el crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* en el medio LGIP.

La producción del ácido acético nos indica que las enzimas PQQ-ADH y PQQ-ALDH, están activas ya que se está oxidando el etanol de manera adecuada.

Es de suma importancia tener un control óptimo de pH, ya que la enzima PQQ-ADH es susceptible, y su rango de actividad oscila entre pH 4 y 8⁷⁵ (Figura 4.6).

⁷⁴ Gómez Manzo Saúl. i *bid Ref.* 38.

⁷⁵ Gómez M. S., Contreras Z. M., González V. A., Sosa T. M.E., Arreguin E., Escamilla M. E. (2008). The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *International Journal of Food Microbiology*. 125, pp 71-78

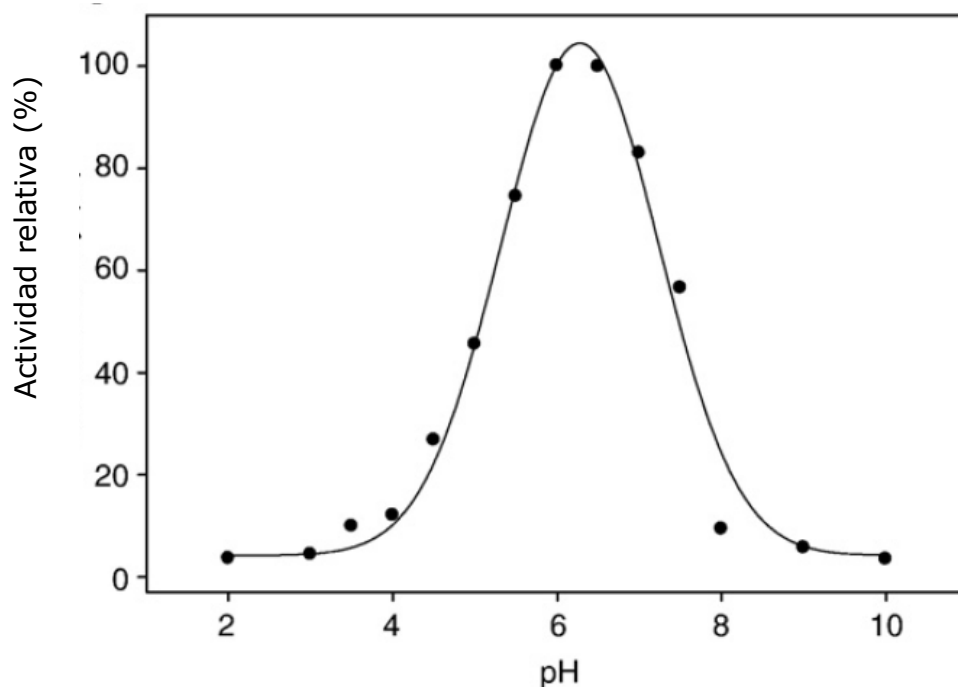


Figura 4.6. Perfil de pH para la actividad de etanol-ferricianuro de la reductasa.

4.2.3. Aireación en el medio.

El último factor monitoreado fue el oxígeno disuelto en el medio.

Se observó una disminución en la concentración de oxígeno al paso del tiempo como se muestra en la Figura 4.7, generando un ambiente anaerobio a pesar de la alta aireación inyectada al medio.

Es de suma importancia la presencia de oxígeno ya que ayuda a la oxidación de sustratos y la obtención de energía.

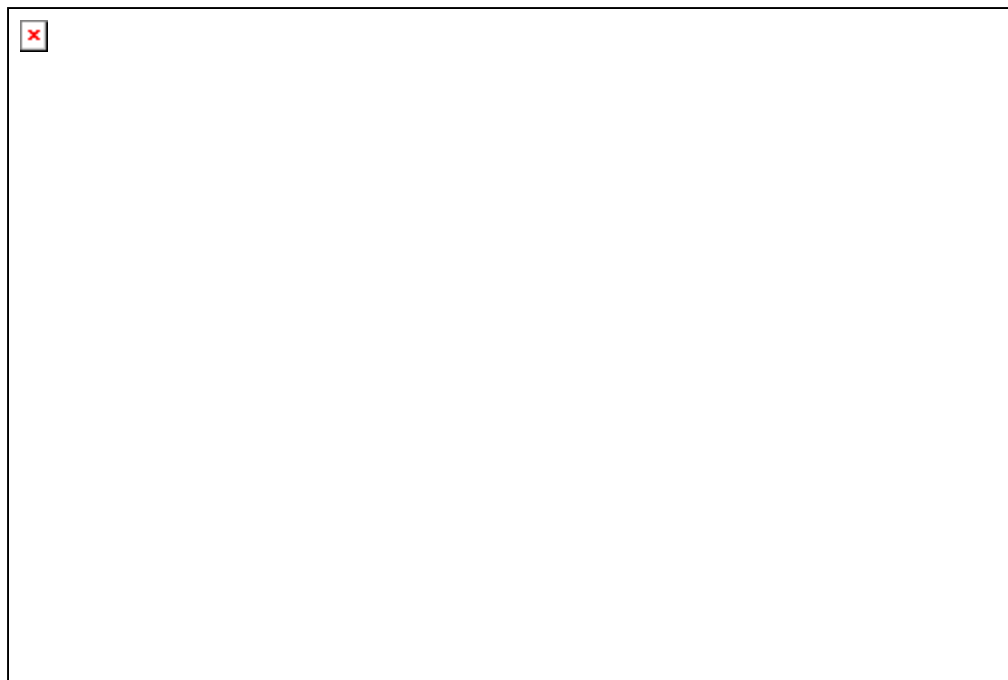


Figura 4.7. Curva de control de oxígeno disuelto en el medio monitoreada durante el crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*

4.3. Obtención de la enzima PQQ-ADH.

Posterior al tiempo de incubación se dio inicio a la extracción de células para la obtención de la enzima PQQ-ADH.

Se realizó la centrifugación del medio de cultivo a 8,000 r.p.m para recuperar las células, las cuales, fueron lavadas con solución amortiguadora PCM para retirar cualquier exceso de medio de cultivo y células muertas, se hizo uso de este proceso por duplicado. Obteniendo un aproximado de 9 Kg de células activas.



Figura 4.8. Células recuperadas por centrifugación después del tiempo de incubación.

La extracción de la enzima ADH-PQQ se inició con una cantidad de células de 500 g resuspendidas en solución amortiguadora PCM, añadiendo proteasas y DNAsas para proteger la enzima al realizar la sonicación, con el fin de romper la membrana celular.

Las membranas que no pudieron romperse bajo este método, fueron separadas mediante centrifugación, recuperando el pellet y lavándolo con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM a pH 6 adicionando Tritón X-100 al 0.7% para solubilizar la enzima extraída.

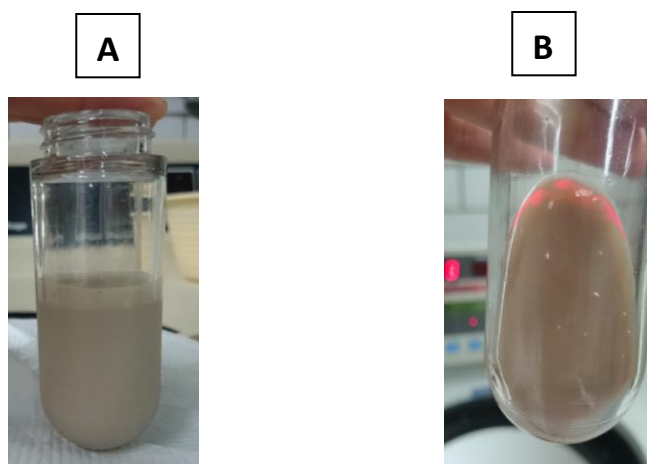


Figura 4.9. A) Suspensión de membranas después de ser sonicadas listas para ultracentrifugación. B) Membranas recuperadas después de la ultracentrifugación.

Las membranas recuperadas se mantuvieron en incubación por 24 horas a 4 °C con agitación constante, en un buffer de fosfatos 10 mM, pH 6.0 con Tritón X-100 al 0.7 %.

Estas condiciones son de suma importancia ya que se crea un ambiente óptimo para que la enzima pueda seguir activa y sin peligro de desnaturalización al ser extraída.

Al finalizar el tiempo de incubación se llevó a cabo una última ultracentrifugación para separar los residuos de membranas sonicadas y así poder obtener un sobrenadante de color rojo, el cual nos indica la presencia de la enzima PQQ-ADH en su estado reducido.



Figura 4.10. Sobrenadante final, enzima PQQ-ADH lista para ser purificada.

4.4. Purificación de la PQQ – ADH de la *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

4.4.1. Cromatografía en columna.

La técnica de separación utilizada para la purificación de la enzima PQQ-ADH fue la cromatografía en columna, por medio de distintas resinas (intercambio iónico, afinidad y exclusión molecular).

4.4.1.1. Columna QAE – Toyopearl.

La primera columna se empacó con una resina QAE – Toyopearl de intercambio aniónico fuerte, basándose en la elución de menor a mayor fuerza de unión, controlada por carga eléctrica.

Para este tipo de resinas de intercambio iónico, la enzima va a eluir a un pH superior a su punto isoeléctrico, para no ser retenida.

La resina QAE-Toyopearl tiene un tamaño de partícula de 40 a 120 μm para proteínas entre 1 y 10^2 kDa, con una estructura:



Se inyectó el sobrenadante color rojo obtenido a la columna con flujo de 2.5 mL/min.

Por espectroscopia de UV-visible a $\lambda = 280$ nm el espectro se muestra en la Figura 4.11, se observa un pico de absorción ancho, indicándonos que aún se registra presencia de impurezas de otras enzimas.

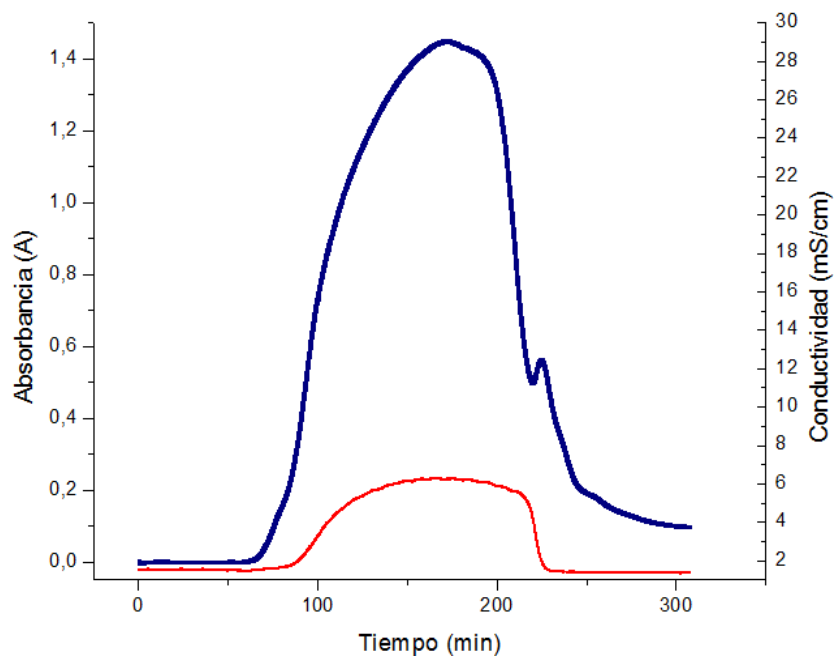
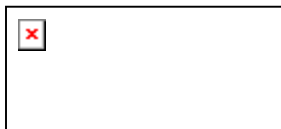


Figura 4.11. Patrón de elución de la columna QAE. El color azul nos indica la absorbancia y el color rojo la conductividad.

4.4.1.2. Columna DEAE-Toyopearl.

Continuando con el proceso de purificación se hizo uso de la de una columna de purificación conteniendo la resina DEAE-Toyopearl de intercambio aniónico débil, con un tamaño de partícula de 65 μm para proteínas entre 10 y 10³ kDa, con una estructura:



Se inyectó el sobrenadante color rojo obtenido y concentrado de la columna anterior (con resina QAE- Toyopearl) en la columna con resina DEAE-Toyopearl a un flujo de 2.5 mL/min.

Por espectroscopia de UV-visible a $\lambda = 280$ nm el espectro se muestra en la Figura 4.12, se observa un pico de absorción muy ancho con poca resolución, mostrándonos presencia de otras enzimas.

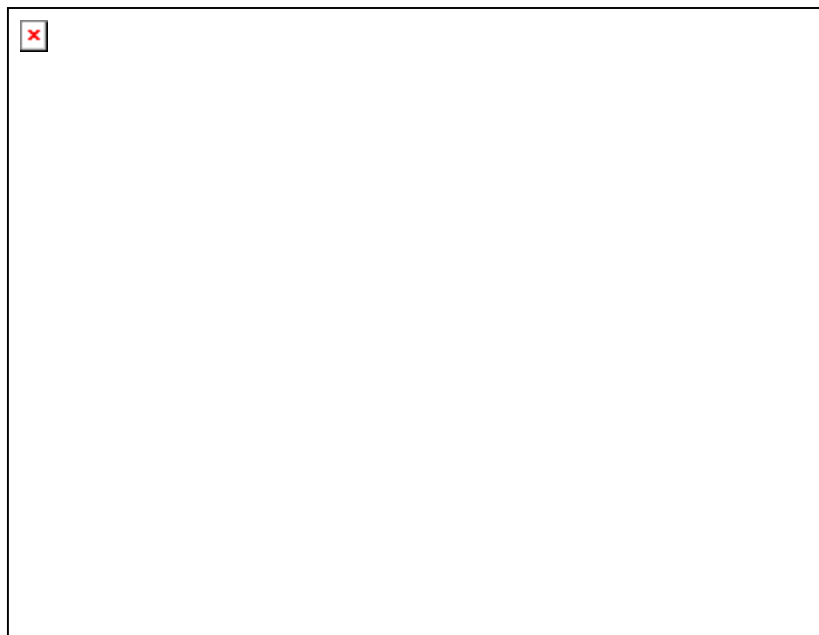
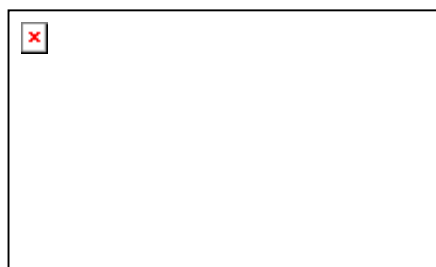


Figura 4.12. Patrón de elución de la columna DEAE. El color azul nos indica la absorbancia y el color rojo la conductividad.

4.4.1.3. Columna Hidroxiapatita-Ultrogel.

La siguiente columna utilizada para continuar con la purificación de la enzima PQQ-ADH, estaba empacada con la resina de afinidad, con un tamaño de partícula de 60 – 180 μm para proteínas de 5×10^3 kDa, con una estructura:



De nueva cuenta la fracción obtenida y concentrada de la columna anterior se inyectó en la columna que contenía a la resina Ha-Ultrogel, a un flujo de 2.5 ml/min observando que a diferencia de las dos resinas anteriores, la enzima quedaba retenida en la resina.

Se utilizó un gradiente lineal de fosfatos de 0 a 250 mM, para poder recuperar la enzima de interés, obteniendo un espectro de UV-visible a $\lambda = 280$ nm el cual se muestra en la Figura 4.13.

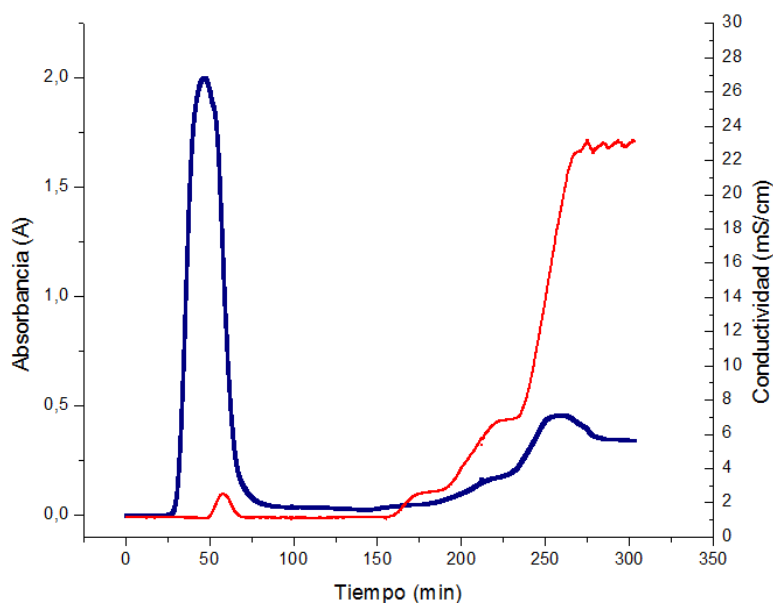
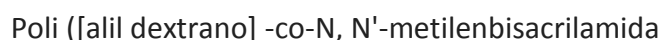


Figura 4.13. Patrón de elución de la columna Ha-Ultrogel. El color azul nos indica la absorbancia y el color rojo la conductividad.

Lo que podemos observar en este patrón es que el pico de elución se define más comparándolo con las columnas anteriores, esto nos indica que el proceso de purificación está siendo eficiente para la enzima PQQ—ADH.

4.4.1.4. Columna Sephacryl S-100.

La última columna utilizada se empacó con una resina de exclusión molecular, Sephacryl S-100, con un tamaño de partícula de 25 a 75 μm para proteínas entre 1000-1500 kDa, con una estructura:



La fracción concentrada de la columna anterior se inyectó en la última columna empacada con la resina Sephacryl S-100, a un flujo de 0.5 ml/min.

Por espectroscopia de UV-visible a $\lambda = 280$ nm el espectro se muestra en la Figura 4.14, se observa un pico de absorción uniforme, indicándonos una buena separación de nuestra enzima de interés.

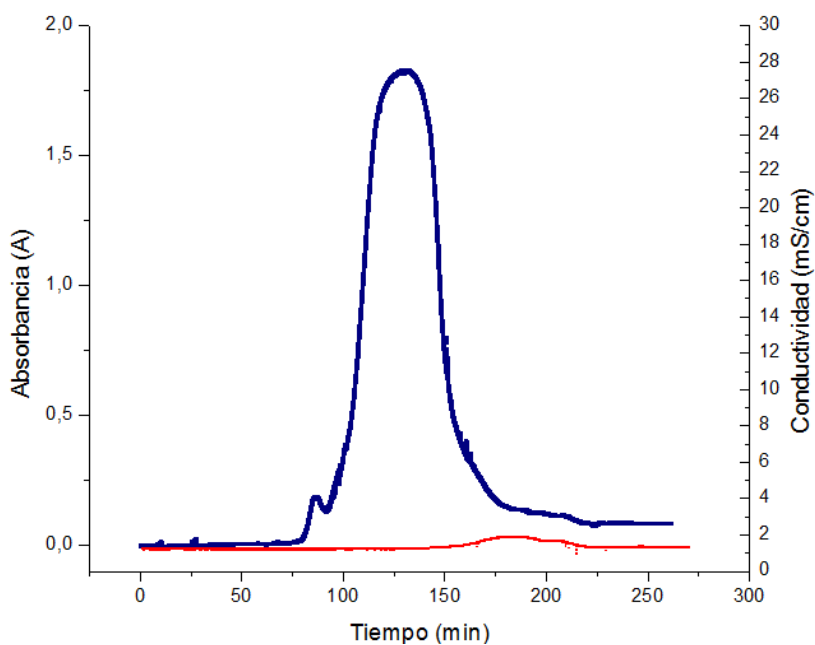


Figura 4.14. Patrón de elución de la columna Sephacryl S-100. El color azul nos indica la absorbancia y el color rojo la conductividad.

Al finalizar el proceso de purificación se obtuvieron 3 mL de la enzima pura y con una concentración 11 mg/mL, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

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

Pasos de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)
Solubilizado de membranas	1227	1773	1.4
QAE	188	1670	8.9
DEAD	106	1628	15.4
Ha	20	1619	80.9
Sephacryl S-100	3	718	293.3

El siguiente análisis nos indica el cambio aparente de actividad específica de la fracción obtenida en cada columna empleada para este procedimiento. El aumento se percibe más notorio pasando de la columna hidroxapatita (Ha) a la columna Sephacryl S-100 y destacando una mayor pérdida de enzima PQQ-ADH. Se realizaron modificaciones al método ya descrito en trabajos anteriores (Gómez-Manzo, 2007), al iniciar con las columnas de intercambio iónico se empleaban gradientes de NaCl y buffer con un pH superior al punto isoeléctrico esto requería del uso de diálisis propiciando una pérdida considerable de proteína. En el presente trabajo, realizamos modificaciones en cuanto al pH del buffer empleado que fue inferior al punto isoeléctrico reportado para la proteína, favoreciendo una menor pérdida.

4.5. Caracterización molecular.

4.5.1. Electroforesis (SDS-PAGE).

Obtenida la enzima del proceso de purificación, se concentró y se analizó por electroforesis con un gel desnaturante de poliacrilamida, el cual es un método para identificar

y monitorear enzimas durante el proceso de purificación, también empleado para la determinación del peso molecular de las subunidades de la enzima.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador bis-acrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato.⁷⁶

Se hizo uso del detergente SDS el cual desnaturaliza por completo las proteínas y rompe las interacciones no covalentes que determinan la estructura terciaria y cuaternaria.⁷⁷

Al realizar el gel desnaturizante (PAGE-SDS) se determinó la composición oligomérica, observando dos bandas teñidas por el colorante añadido azul de bromo fenol y resaltadas con azul de coomassie, a pesos moleculares similares a los ya reportados en la literatura⁷⁸, como se muestra en la Figura 4.15.

Siendo la primera banda cercana a 72 KDa, asignándola a la primera subunidad (SUI) y otra banda cercana a 44 KDa asignándola a la segunda subunidad (SUII).

⁷⁶ Garfin DE. (1990). One dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. 182, pp 50-79.

⁷⁷ García HM. (2000). Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. [Tesis de Maestría.] Facultad de Biología UH.

⁷⁸ Gomez Manzo S. *ibid Ref.* 38.

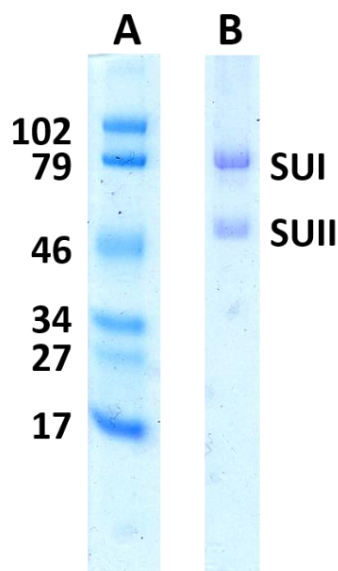


Figura 4.15. A) Marcador de pesos moleculares usado como referencia. **B)** Enzima PQQ-ADH bajo condiciones desnaturalizantes.

4.6. Caracterización espectroscópica.

4.6.1. Análisis de los grupos prostéticos PQQ y hemo tipo c por espectroscopia electrónica UV-visible.

El espectro de UV-visible de la enzima PQQ-ADH nos mostró señales asignadas al grupo prostético PQQ⁷⁹ con máximas en 313 y 350 nm, estas señales se deben a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de la conjugación del sistema aromático desplazando las señales de absorción cercanas al visible.

Los hemo tipo c en estado reducido pertenecientes a la enzima PQQ-ADH mostraron señales máximas características en 417, 523 y 554 nm como es presentado en la Figura 4.16.

Los hemo se encuentran dominados por las contribuciones del anillo de porfirina, conformado por grupos conjugados, esto evita la adecuada observación de las bandas de absorción d - d que son débiles.

⁷⁹ Gómez M. S., Solano P. A., Saucedo V. J. P., Escamilla M. J. E., Kroneck M. H. P. and Sosa T. M. E. (2010). The Membrane-Bond Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*, 49, pp 2409-2415.

El espectro se observa con frecuencia en el intervalo visible del espectro ya que las señales se deben a transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, esto es consecuencia del alto grado de deslocalización de los electrones y por lo tanto una disminución de la energía requerida para una transición electrónica⁸⁰.

Con ayuda del espectro de UV-visible se pudo determinar, con la diferencia de absorbancias entre la banda β (523 nm) de la enzima PQQ-ADH reducida y el mínimo en 540 nm de la enzima PQQ-ADH oxidada, el coeficiente de absortividad molar de los citocromos de la PQQ-ADH es de $782 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La longitud de onda de las bandas α y β localizadas en la región comprendida entre 500-600 nm y la ausencia de bandas en el intervalo 630-650 nm, nos sugiere que los hemos tipo c de esta enzima están en estado de bajo espín.⁸¹

⁸⁰Gouterman M. (1961). Spectra of Porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*. 6, pp 138-163.

⁸¹Róldan M. D., Sears H. J., Cheesman M. R., Ferguson s. j., Thomson A. J., Berks B. C. and Richardson D. J.(1998). Spectroscopic characterization of a novel multiheme c-type cytochrome widely implicated in bacterial electron transport. *Journal Biological Chemistry*. 273(4), pp 28785-28790.

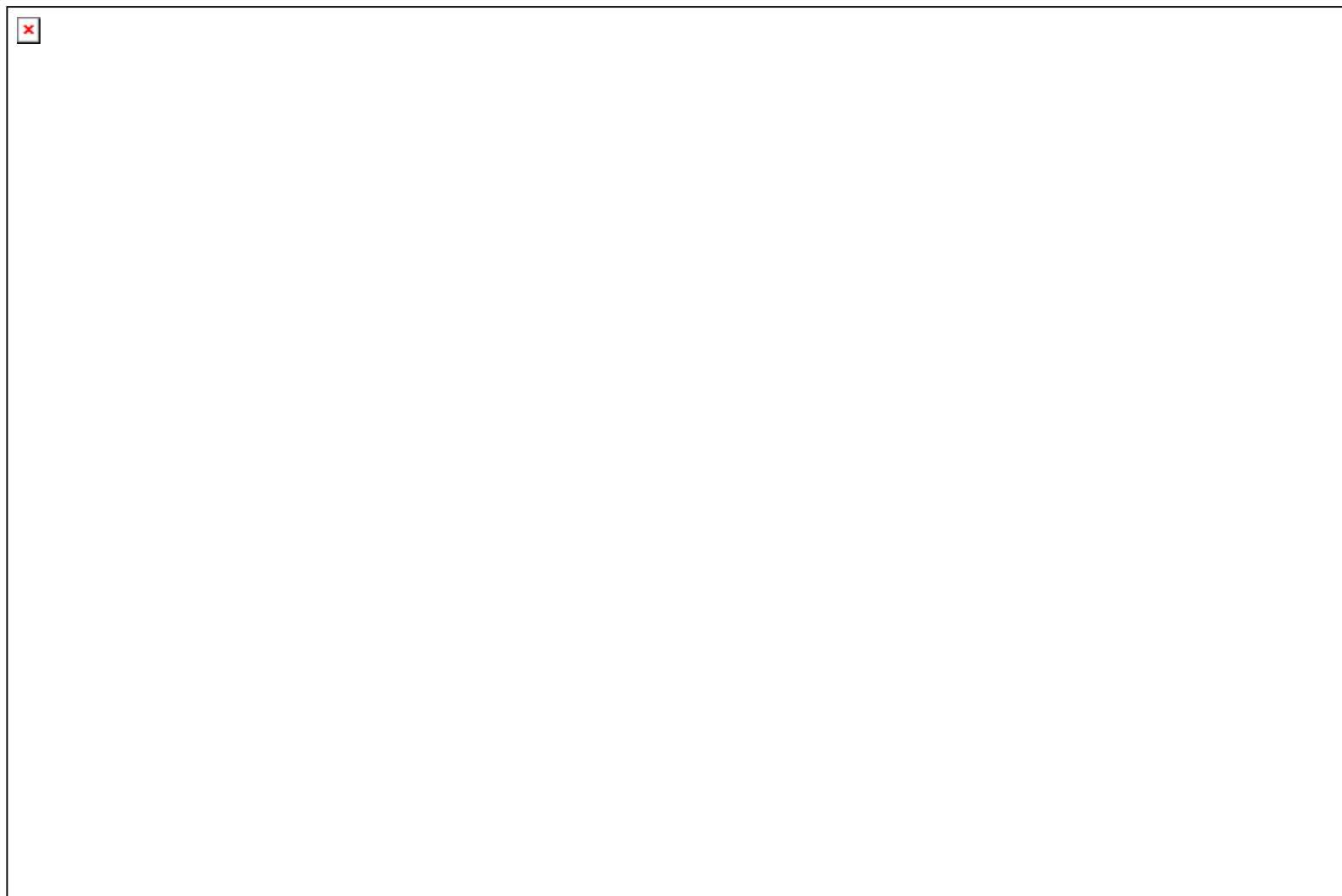


Figura. 4.16. Espectro de UV-Vis de la PQQ-ADH concentración 10 mg/mL de *Ga. diazotrophicus*.

4.6.2. Análisis de los grupos prostéticos PQQ, [2Fe-2S] y citocromos tipo c por RPE de la ADH aislada y purificada.

La enzima reducida, recién aislada, pura y concentrada se midió por Resonancia Paramagnética Electrónica, operando con banda X (≈ 9.4 GHz) en modo perpendicular, bajo condiciones de no saturación, potencia de 2 mW, modulación de 100 kHz y a una temperatura de 10 K, esta temperatura es empleada para aumentar los tiempos de relajación de los átomos de hierro (II/III) en el sistema.

Se obtuvo un espectro en el que se muestra resonancia a $g=2.004$, esta señal intensa es característica de radicales orgánicos^{82,83} que en la ADH aislada, se asigna a una señal isotrópica del radical semiquinona PQQ como se observa en la Figura 4.18.

Analizando el mismo espectro, se puede observar una señal anisotrópica con resonancia en $g=1.930$ y $g=1.911$, las que nos indican la presencia de un cúmulo [2Fe-2S] como se muestran en la Figura 4.8.2.

Se realizó un acercamiento para poder apreciar con mayor definición las señales asignadas al radical orgánico PQQ* y al cúmulo [2Fe-2S] (Figura 4.19).

Este acercamiento al espectro como se observa en la Figura 4.19, nos muestra que el cúmulo en estado reducido tiene una señal rómbica, con otro valor de $g=2.007$ ⁸⁴, la cual no podemos observar debido al radical orgánico de la semiquinona, que tiene una mayor intensidad y por lo tanto la señal del cúmulo se encuentra solapada.

En el estado reducido como se encuentra la enzima PQQ-ADH al aislarla, no se pueden observar señales que nos indiquen presencia de algún citocromo tipo c.

Los iones hierro pertenecientes a los citocromos tipo c de la enzima PQQ-ADH están en forma reducida (Fe^{2+}), poseen seis electrones en orbitales 3d.

Cuando cuatro de los electrones están localizados en los orbitales t_{2g} y dos electrones en los orbitales e_g , el espín total es 2 (configuración de alto espín). Cuando los seis electrones del ion

⁸² Kay C. W. M., Mennenga B., Görisch H., Bittl R. (2006). Structure of the Pyrroloquinoline Quinone Radical in Quinoprotein Ethanol Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 281(3), pp 1470-1476.

⁸³ Gómez M. S., *ibid Ref.38*.

⁸⁴ Gómez M. S., *ibid Ref.38*.

hierro (II) se disponen en orbitales t_{2g} , no queda ningún electrón desapareado por lo tanto el espín total es 0 (configuración de bajo espín).

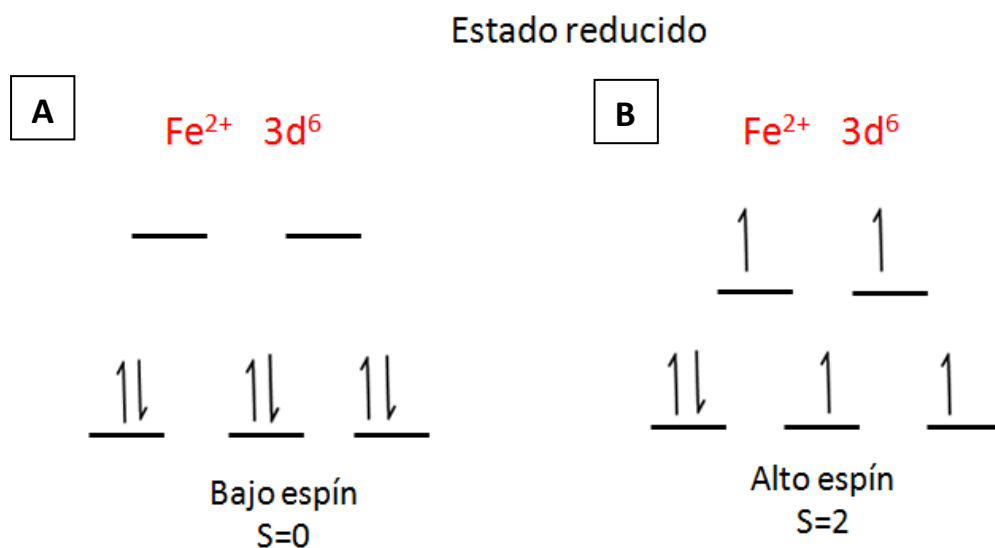


Figura 4.17. **A)** Configuración de Fe^{2+} de bajo espín. **B)** Configuración de Fe^{2+} de bajo espín en ambiente octaédrico.

El hierro(II) de bajo espín es una especie diamagnética, por lo tanto no se podrá apreciar ninguna señal por la técnica de RPE.

La especie de alto espín es una especie paramagnética, sin embargo, no se puede apreciar ninguna señal característica, conocida como señal silenciosa en EPR.

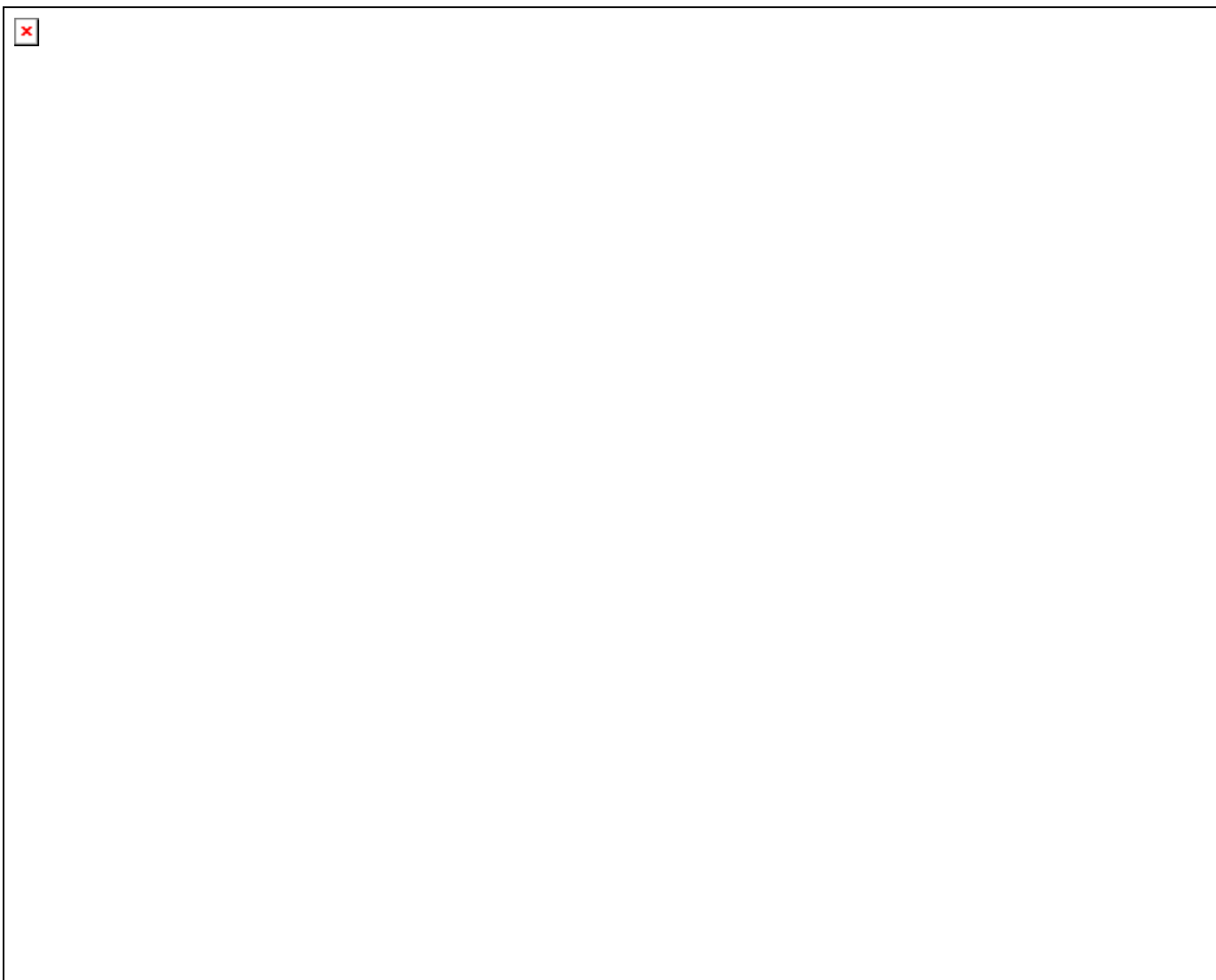


Figura 4.18. Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH reducida recién purificada en estado reducido de *Ga diazotrophicus*. Condiciones: Modo perpendicular a 10 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.392166 GHz.

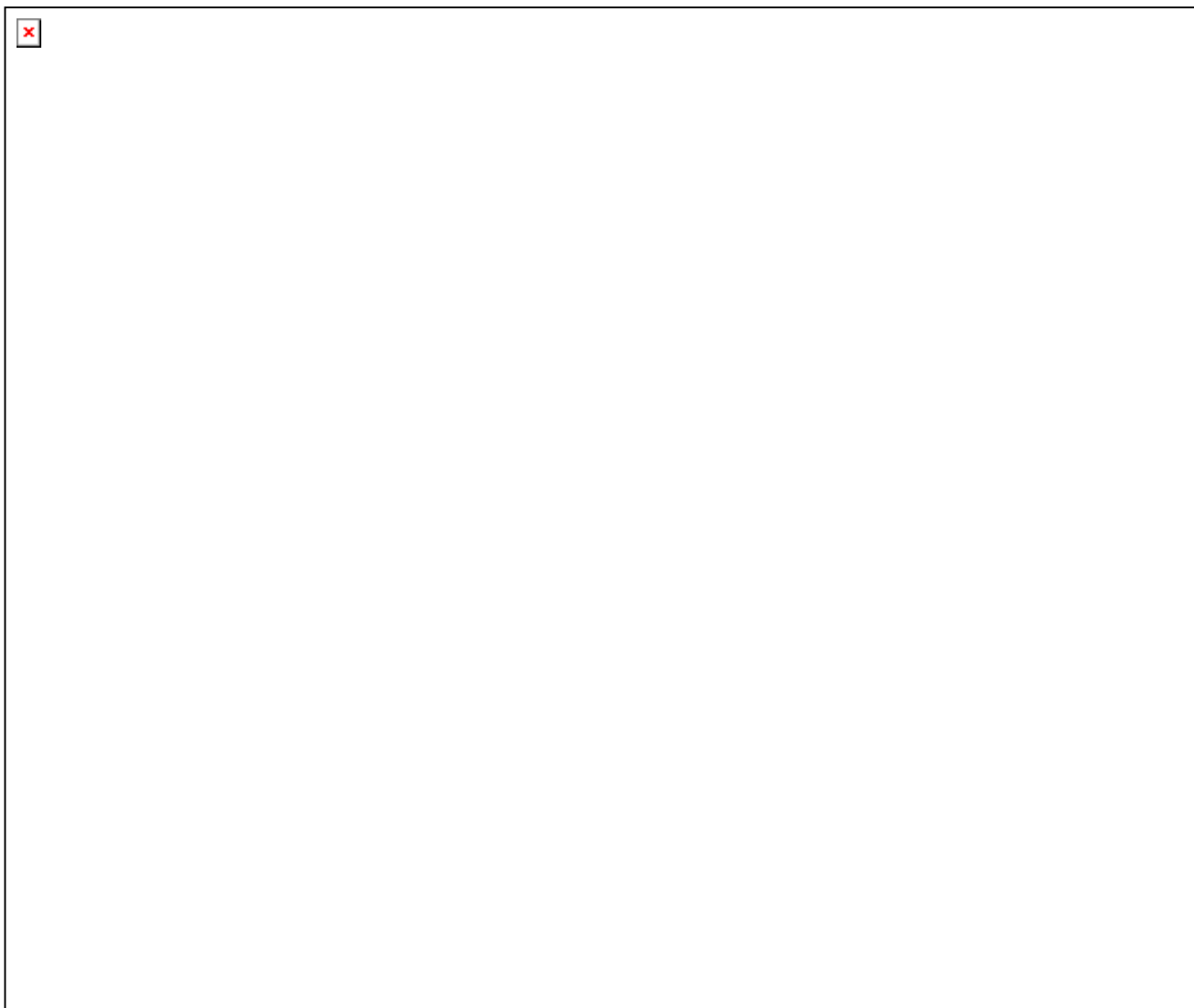
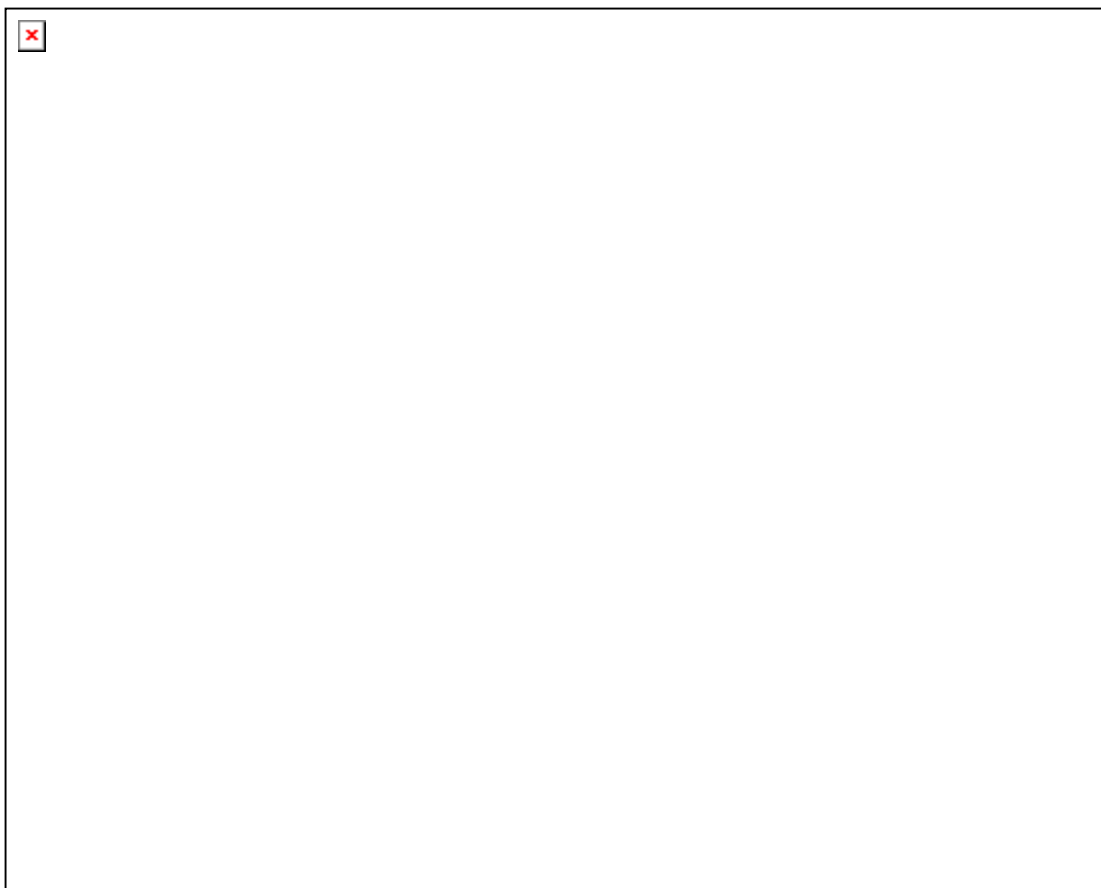


Figura 4.19. Detalle del Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH reducida recién purificada en estado reducido de *Ga diazotrophicus*.

Condiciones: Modo perpendicular a 10 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.381409 GHz.

4.6.3. Análisis redox de la enzima PQQ-ADH.

Se inició el análisis redox tomando como referencia una medición por EPR realizada con anterioridad por el grupo de trabajo tal como se muestra en la Figura 4.20. Este espectro se tomó a partir de la oxidación de la enzima PQQ-ADH con $K_4[Fe(CN)_6]$, en el cual notamos una señal isotrópica $g_{iso} = 2.003$ referente al radical PQQ^\bullet , con respecto a la señal típica del cúmulo $[2Fe-2S]$ no hay evidencia ya que se encuentra oxidada, también otra señal definida con $g_1 = 4.294$, descrita en la literatura⁸⁵ como un hemo c de alto espín y otras señales $g_2 = 3.265$, $g_3 = 2.936$ y $g_4 = 2.229$ que se encuentran montadas sobre la señal del $K_4[Fe(CN)_6]$ ($FeCy$) y que hasta este momento no se pueden asignar, se requieren más experimentos.



⁸⁵ Upadhyay A. K., Petasis T., Arciero D. M., Hooper A. B. and Hendrich M. P. (2002). Spectroscopic characterization and assignment of reduction potentials in the tetraheme cytochrome C_{554} from *Nitrosomonas Europaea*. *Journal of American Chemistry Society*. 127 (7), pp 1738 – 1747.

Figura 4.20. Espectro de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada con $K_4[Fe(CN)_6]$. Condiciones: Modo perpendicular a 10 K; concentración de 15 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.342455 GHz.

El análisis anterior nos permitió tomarlo como referencia e iniciar otro experimento para poder asignar todas las señales de los grupos hemos y además asignarlos a cada potencial redox pertenecientes a la enzima PQQ-ADH. Para lograrlo fue indispensable realizar una mezcla de 6 quinonas que participaron como amortiguadores redox. El monitoreo fue realizado a una longitud de onda de 553 nm, y cuando se llegó a un punto de inflexión, se tomó una alícuota que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (77K). A partir de la información de los espectros electrónicos se obtuvo una curva de titulación redox mostrada en la Figura 4.21, en la cual se pueden corroborar cuatro puntos de inflexión correspondientes a los hemos tipo c tales como se describen en la literatura^{86,87}, siendo los siguientes valores: - 55 mV, + 42 mV, + 132 mV, +227 mV.

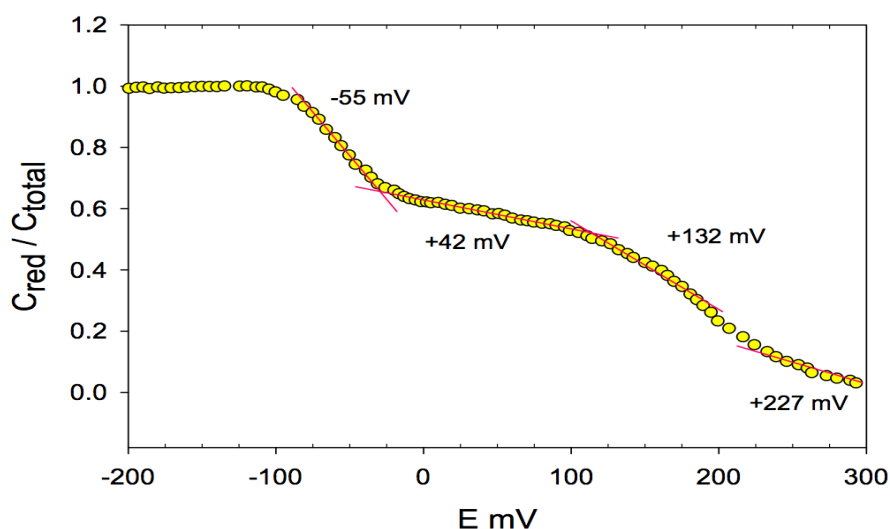


Figura 4.21. Titulación potenciométrica de los hemos c de la enzima ADH de la *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Realizada en una solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 6 a temperatura ambiente en presencia de la siguiente mezcla de quinonas: la antroquinona-2-sulfonato (-225 mV), la 2-hidroxi-1-4 naftoquinona (-45 mV), la menadiona (0.0 mV), la duroquinona (50 mV), la 1,4 naftoquinona (+134 mV) y finalmente la 1,4-benzoquinona (+285 mV) a una concentración final de 50 mM.

⁸⁶ Gómez-Manzo S., Solano-Peralta A., Saucedo-Vázquez J.P., Escamilla-Máran E., Kroneck P. M. H., and Sosa-Torres M. E. (2010). The Membrane –Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobater diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*. 49, 2409-2415.

⁸⁷ Chávez-Pacheco J. L., Contreras-Zentella J., Membrillo-Hernández J., Arreguín-Espinoza R., Mendoza-Hernandez G., Gómez-Manzo S., Escamilla J. E. (2010). The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobater xylinus* : molecular and catalytic properties. *Arch Microbiol*. 192: 703-713.

Se repitió el experimento anterior mejorando las condiciones de trabajo, obteniendo con mayor los potenciales redox correspondientes a cada grupo hemo tipo *c*, siendo: -64 mV, -8 mV, +185 mV y +210 mV. Estos puntos corroboran la presencia de los cuatro grupos hemo tipo *c* pertenecientes a la enzima PQQ-ADH tal como se ha visto en la literatura.^{88,89}

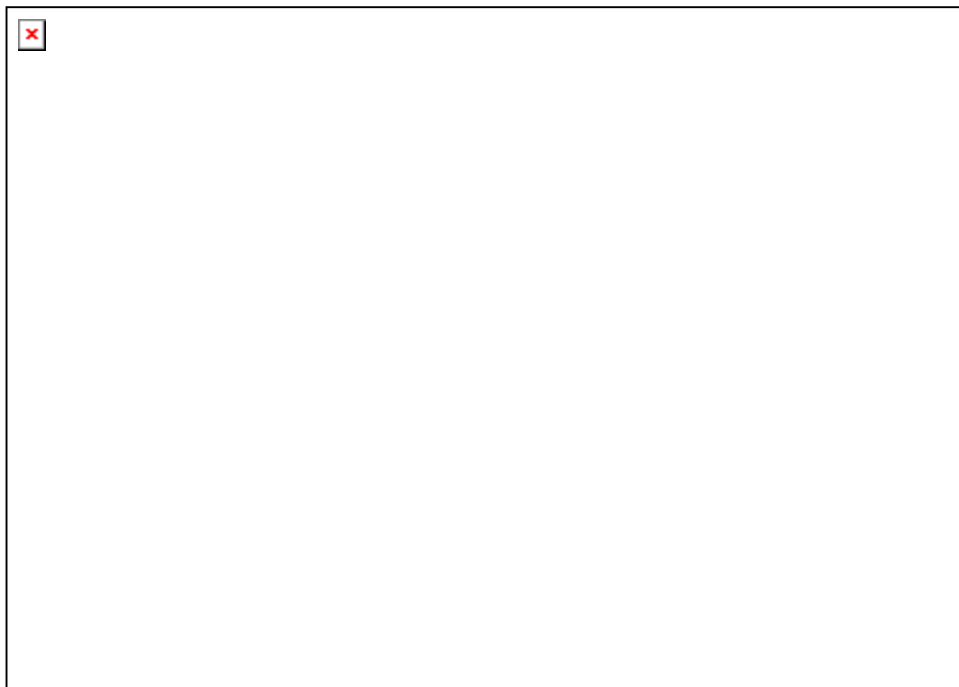


Figura 4.22. Normalización de la curva potenciométrica de los hemos *c* de la enzima ADH de la *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Realizada en una solución amortiguadora de fosfato 10 mM, pH 6 a temperatura ambiente en presencia de la siguiente mezcla de quinonas: la antroquinona-2-sulfonato (-225 mV), la 2-hidroxi-1-4 naftoquinona (-45 mV), la menadiona (0.0 mV), la duroquinona (50 mV), la 1,4 naftoquinona (+134 mV) y finalmente la 1,4-benzoquinona (+285 mV) a una concentracon final de 50 mM.

Las alícuotas tomadas en cada punto de inflexión de la curva de titulación, se analizaron por EPR a 4 K en banda X (≈ 9.4 GHz) en modo perpendicular, bajo condiciones de no saturación, potencia de 2 mW, modulación de 100 kHz.

⁸⁸ Gómez-Manzo S., Solano-Peralta A., Saucedo-Vázquez J.P., Escamilla-Máran E., Kroneck P. M. H., and Sosa-Torres M. E. (2010). The Membrane –Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobater diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

⁸⁹ Chávez-Pacheco J. L., Contreras-Zentella J., Membrillo-Hernández J., Arreguín-Espinoza R., Mendoza-Hernandez G., Gómez-Manzo S., Escamilla J. E. (2010). The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobater xylinus* : molecular and catalytic properties. *Archives of Microbiology*. 192, pp 703-713.

El primer espectro de RPE (Figura 4.23), corresponde al primer potencial obtenido -64 mV, este es bajo en comparación a los tres hemo presentes en la enzima PQQ-ADH ya que es la entrada del primer electrón imponiendo un potencial redox negativo, lo que hace que la oxidación de los siguientes grupos hemo sea menos favorable⁹⁰. En este espectro de RPE se muestra una señal rómbica con resonancia en $g_x= 10.855$, $g_y=6.029$ y $g_z= 4.259$ que corresponden a señales típicas de Fe(III) de alto espín.⁹¹

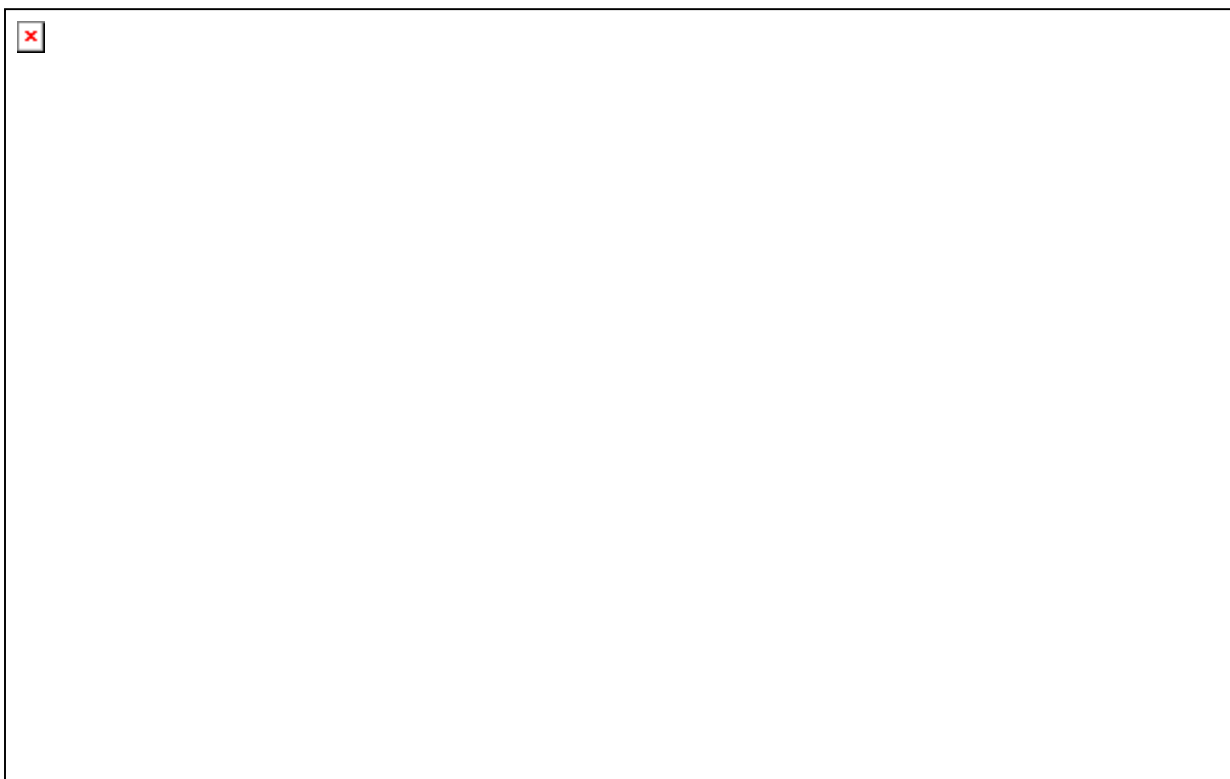


Figura 4.23. Espectro de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada con una solución amortiguadora de quinonas a un potencial de -64 mV. Condiciones: Modo perpendicular a 4 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.390102 GHz.

⁹⁰ Moore R. G., Pettigrew W. G. (1990). Cytochrome c. Evolutionary, Structural and Physicochemical aspects. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.p 307-340

⁹¹ Slappendel S., Veldink G. A., Vliegthart J. F. G., Aasa R. and Malmstrom B. G. (1981). EPR Spectroscopy

Siguiendo con la titulación, llegamos al segundo punto de inflexión con un potencial de -8 mV, al ser analizada por EPR la alícuota tomada en este punto (Figura 4.24), podemos observar una nueva señal anisotrópica en $g_x = 3.935$ correspondiente a un grupo hemo c de bajo espín.⁹² Cabe mencionar que esta señal se encuentra sobre la señal del $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3+}$ que es el agente oxidante.

Dentro de este espectro, podemos seguir notando la presencia de la señal rómbica de Fe (III) de alto espín prevalece con $g_x = 10.123$, $g_y = 5.907$ y $g_z = 4.224$. De igual manera podemos notar la presencia del cúmulo $[\text{2Fe-2S}]$ ligeramente oxidado con señales en $g_{\text{max}} = 2.019$ y $g_{\text{min}} = 1.991$.

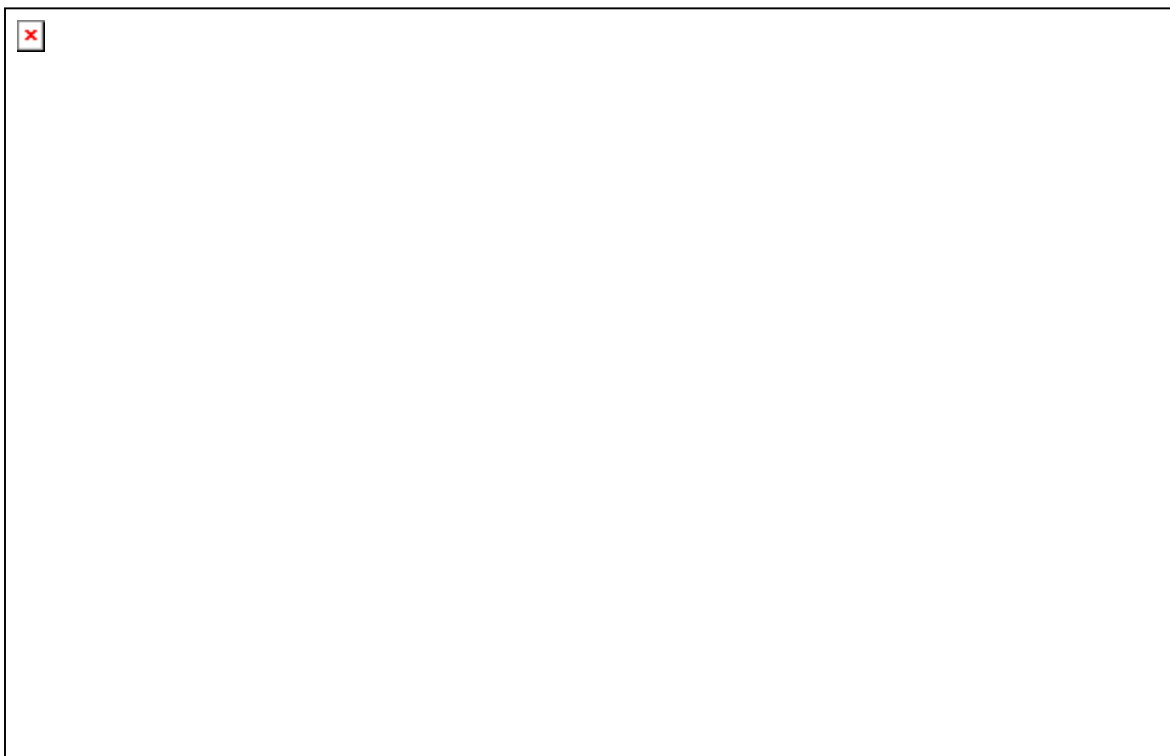
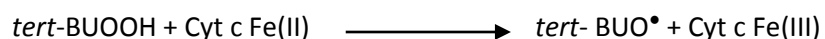


Figura 4.24. Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada con una solución amortiguadora de quinonas a un potencial de -8 mV. Condiciones: Modo perpendicular a 4 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia 9.380581 de GHz.

⁹² Can M., Krucinka J., Zopallero G., Andersen N. H., Wedekind J. E., Hersleth H. P., Andersson K. K. AND Bren K.L. (2013). Structural characterization of *Nitrosomas europaea* cytochrome c-552 variants with marked differences in electronic structure. *ChemBioChem*. 14, pp 1828-1838.

Al analizar los espectros obtenidos por EPR tanto para el tercer y cuarto punto de inflexión (+ 185 y + 210 mV respectivamente), podemos notar que el agente titulante $K_4[Fe(CN)_6]$ y las quinonas usadas como amortiguadores redox aportan unas señales al espectro que nos impide caracterizar las señales referentes a los hemos de bajo espín; por esta razón optamos por cambiar de agente oxidante iniciando un nuevo experimento.

En este otro experimento, se hizo uso de un oxidante que no interfiriera con las señales en la región de los hemos tipo c, el hidroperóxido de tertbutilo (*tert*-BUOOH) fue ideal, ya que al analizar la oxidación de los Fe (III) de los hemos pertenecientes a la enzima PQQ-ADH por EPR, la señal del radical peroxilo formado tal como lo muestra en la reacción⁹³ se identifica por una señal alrededor de $g \approx 2.000$ ⁹⁴ que en nuestro análisis es inexistente por la baja concentración añadida.



El análisis se realizó agregando 1.0 μL de *tert*-BUOOH a una muestra de la enzima PQQ-ADH con agitación constante, inmediatamente se observó un cambio en la coloración pasando de rojo intenso a café, en ese instante la muestra fue congelada bajo nitrógeno líquido (77 K) para ser introducida en el equipo de EPR, obteniendo el espectro correspondiente tal como se muestra en la Figura 4.25 y con más detalle se agrupan las señales con la asignación propuesta en la Figura 4.26.

⁹³ Barr D. P., Mason R. P. (1995). Mechanism of radical production from the cytochrome c with organic hydroperoxides. *Journal of Biological Chemical*. 270(21), pp 1207 – 12716.

⁹⁴ Nantes I. L., Faljoni-Alario A., Nascimento O. R., Bandy B., Gatti R., Bechara E. J.H. (2000). Modifications in heme iron of free and vesicle bound cytochrome c by *tert*-butyl hydroperoxide: A magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance investigation. *Free Radical Biology & Medicine*. 28(5), pp 786-796.

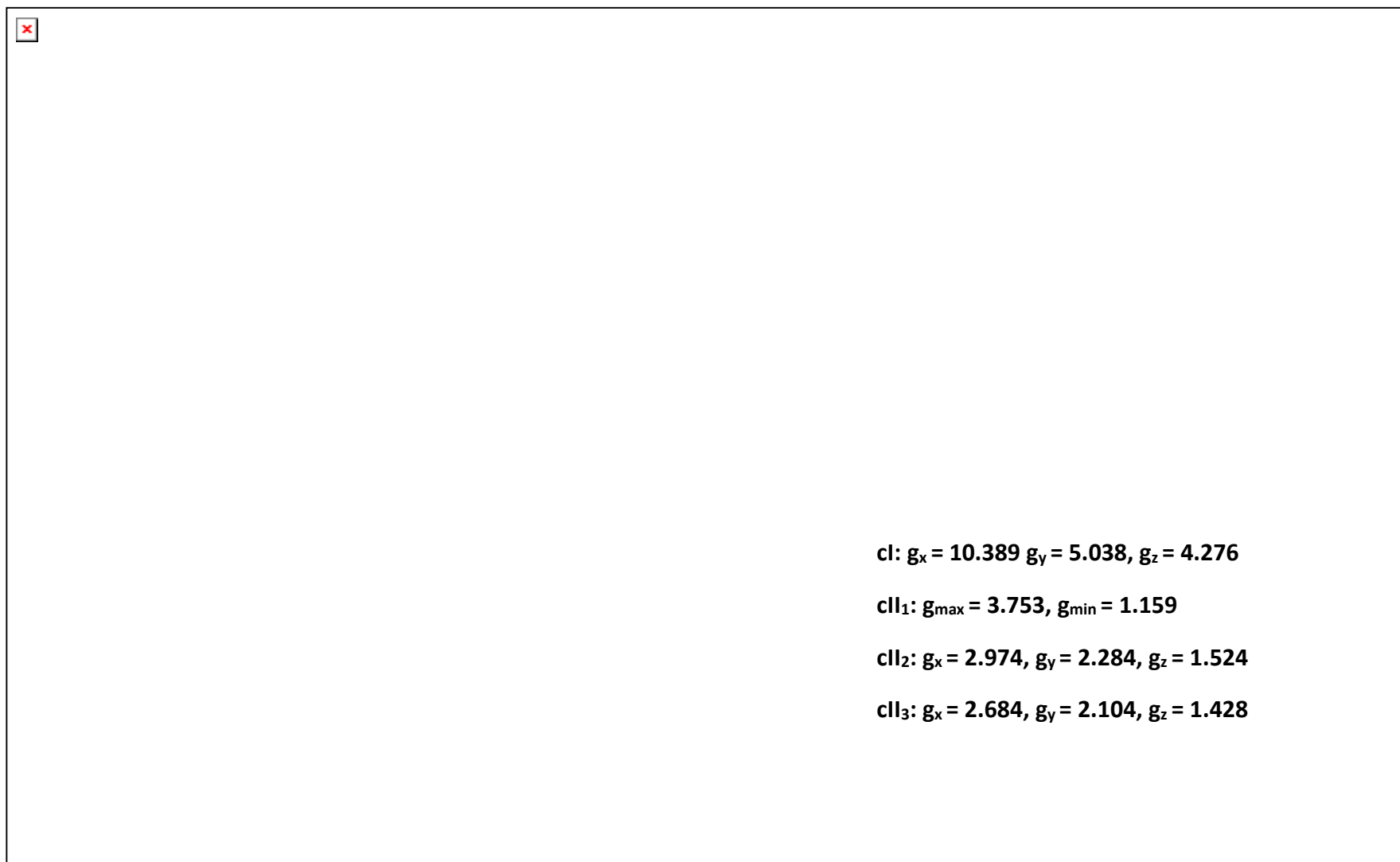


Figura 4.25. Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada con hidroperóxido de terbutilo. Condiciones: Modo perpendicular a 4 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.39415 GHz.

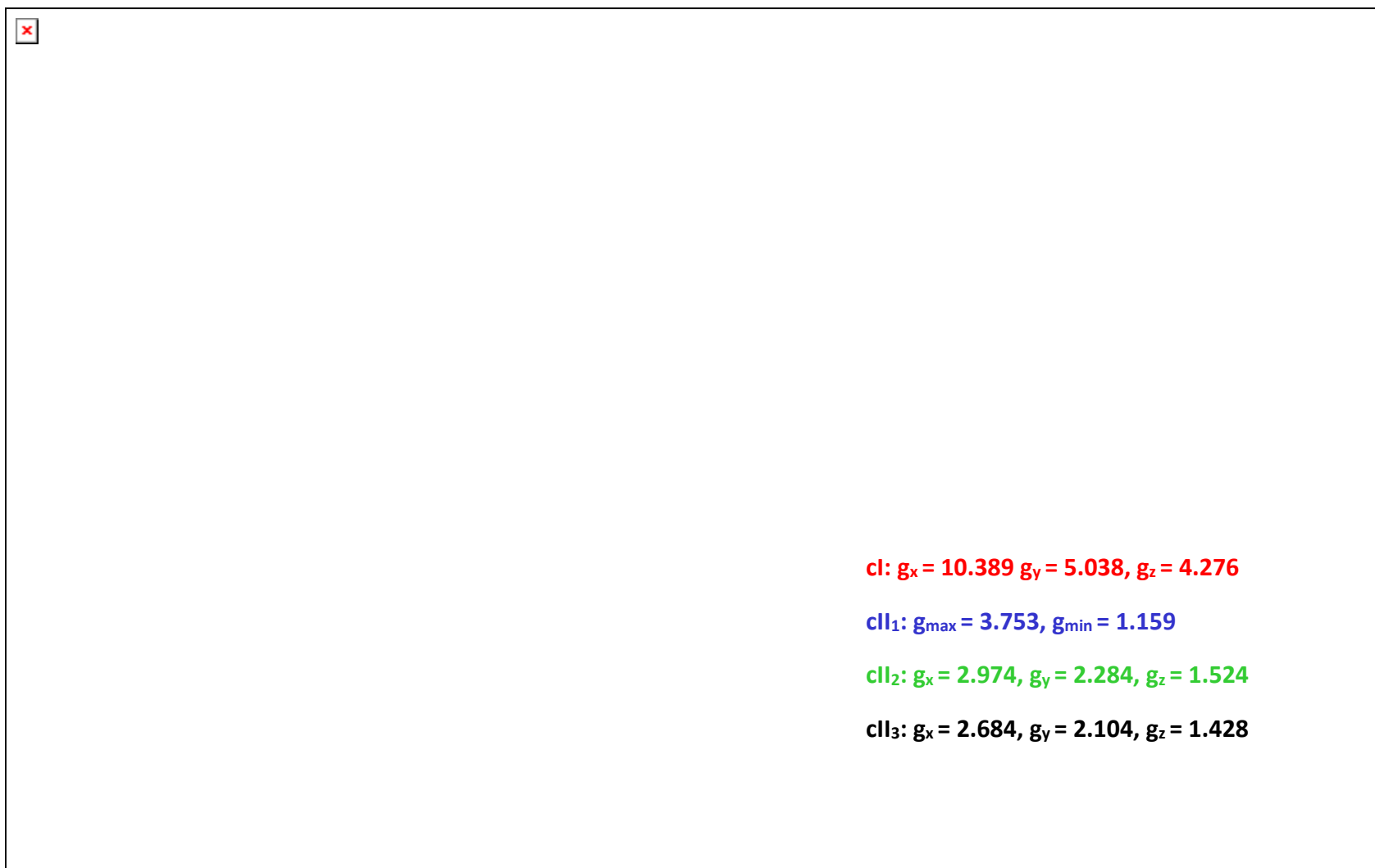


Figura 4.26. Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada con hidroperóxido de terbutilo. Condiciones: Modo perpendicular a 4 K; concentración de 10 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.39415 GHz.

En este espectro se puede asegurar la presencia de señales típicas de un Fe (III) de alto espín⁹⁵ ($S=5/2$) (cl), con la señal rómbica en $g_x= 10.389$, $g_y= 5.058$ y $g_z= 4.276$, estas señales coinciden con las ya indicadas en la oxidación con $K_4[Fe(CN)_6]$. Este primer grupo hemo es el de más bajo potencial redox (-64 mV) y se propone se encuentra dentro de la SUI, en el modelo propuesto con anterioridad dentro del grupo de trabajo.^{96,97}

Se espera que este primer grupo hemo este coordinado al hierro de la porfirina con residuos de histidina y metionina haciéndolo hexacoordinado, esto sucede por efecto del pH, en este proyecto se trabajo en un intervalo de 6.5 a 7, la estructura pentacoordinada se favorece a pH inferior de 4⁹⁸. Esto corrobora la estructura terciaria analizada por secuencia de aminoácidos y propuesta anteriormente dentro del grupo de trabajo⁹⁹.

La siguiente señal que se puede interpretar corresponde al potencial redox de -8.0 mV (cl_1), y se propone sea el primer grupo hemo c situado en la SUII, y que podemos identificar como hierro (III) de bajo espín ($S=1/2$) Tipo I¹⁰⁰, también llamado de bajo espín altamente anisotrópico o de bajo espín axial (HALS) con una señal de resonancia en $g_{max}= 3.753$ otra $g_{min}= 1.159$, como se muestra en las figuras 4.8.8 y 4.8.9. Estos hemos Tipo I se han caracterizado por valores grandes de g_{max} (> 3.3)¹⁰¹ y valores pequeños de $g_{min} \approx 1.17$ como se muestra en la siguiente Figura 4.27, que se presentan cuando un residuo de histidina y uno de metionina están coordinados al hierro en forma perpendicular a la porfirina del anillo.

⁹⁵ Upadhyay A. K., Petasis T., Arciero D. M., Hooper A. B. and Hendrich M. P. (2002). Spectroscopic characterization and assignment of reduction potentials in the tetraheme cytochrome c_{554} from *Nitrosomonas europaea*. *Journal of American Chemistry Society*. 127 (7), pp 1738 – 1747.

⁹⁶ Gómez-Manzo S., Solano-Peralta A., Saucedo-Vázquez J.P., Escamilla-Máran E., Kroneck P. M. H., and Sosa-Torres M. E. (2010). The Membrane –Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

⁹⁷ García-Rubio I., Braun M., Gromov I., Thöny-Meyer L. and Schweiger A. (2007). Axial Coordination of heme in ferric Chaperon Characterized by EPR spectroscopy. *Biophysical Journal*. 92, pp 1361-1373.

⁹⁸ Moreira M. L., Lima, P. M., Costa-Filho, A. J., and Imasato, H. (2006). Pentacoordinate and hexacoordinate ferric hemes in acid medium: EPR, UV-Vis and CD studies of the giant extracellular hemoglobin of *Glossoscolex paulistus*. *Biophysical Chemistry*. 124, pp 62-72.

⁹⁹ Sarmiento Pavía Pedro David. (2006). 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. UNAM

¹⁰⁰ Zopellaro G., Bren K. L., Ensigns A. A., Harbitz E., Kaur R., Harsleth H. P., Ryan U., Hendersent L. and Andersson K. K. (2009). Studies of ferric heme proteins with highly anisotropic highly axial low spin ($S= \frac{1}{2}$) Electron Paramagnetic Resonance signals with bis-histidine . *Biopolymers*. 91(12). pp 1064-1082.

¹⁰¹ Can M., Krucinska J., Zapellaro G., Anderson N. H., Wedekind J. E., Hersieth H. P., Anderson K.K. AND Bren. (2013). Structural characterization of *Nitrosomonas europaea* cytochrome c-552 variants with marked differences in electronic structure. *ChemBioChem*. 14, pp 1828-1838.

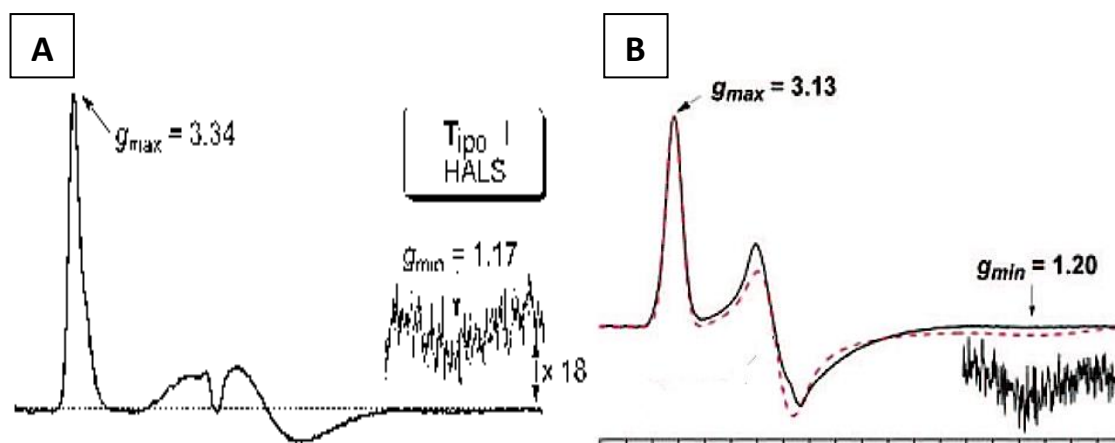


Figura 4.27. Espectros de EPR prototipo de hemo de bajo espín altamente anisotrópicos o de bajo espín axial (HALS). **(A)** Registrado a temperatura criogénica ($T = 10$ K) de la especie *Nitrosomonas euro-paea* (Ne). **(B)** Registrado a temperatura criogénica ($T = 10$ K) de la especie NeN64 Δ ($260 \mu\text{M}$).

A continuación, se observan dos grupo de señales con resonancias en $g_1=2.974$, $g_2=2.284$ y $g_3= 1.524$ (cII_2) y $g_1= 2.684$, $g_2= 2.104$ y $g_3= 1.428$ (cII_3). Estos grupos de señales corresponden a hemo de bajo espín ($S=1/2$) de Tipo II¹⁰² caracterizados cada uno por un espectro rómbico, con valor de $g_{\text{max}} < 3.2$. La asignación de estas señales se hizo por analogía a las reportadas por Qian¹⁰³ [A] y Moura¹⁰⁴ [B](Figura 4.28) en donde se especifica que los valores de g varían según el ángulo que forman las dos histidinas coordinadas axialmente al hierro(III) del grupo hemo.

¹⁰² Nitsche W., Jobawlt M., Rutherford W. (1993). The reaction center associated cytochrome subunit *Chromatium vinosum*. *Biochemistry*. 32, pp 8871-8879.

¹⁰³ Qian M., Mester T., Morgado L., Arakawa T., Sharma M. L., Inoue K., Joseph C., Salgueo C. A., Maroney M. J. and Lovley D. R. (2011). Biochemical characterization of purified OmcS, a c-type cytochrome required for insoluble Fe(II) reduction in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807, pp 404-412.

¹⁰⁴ Moura I., Teixeira M., Huynh B. H., LeGall J. and Moura J. G. (1988). Assignment of individual heme EPR signals of *Desulfovibrio baculatus* (strain 9974) tetraheme cytochrome c_3 . A redox equilibria study. *European Journal of Biochemistry*. 176, pp 365-369.

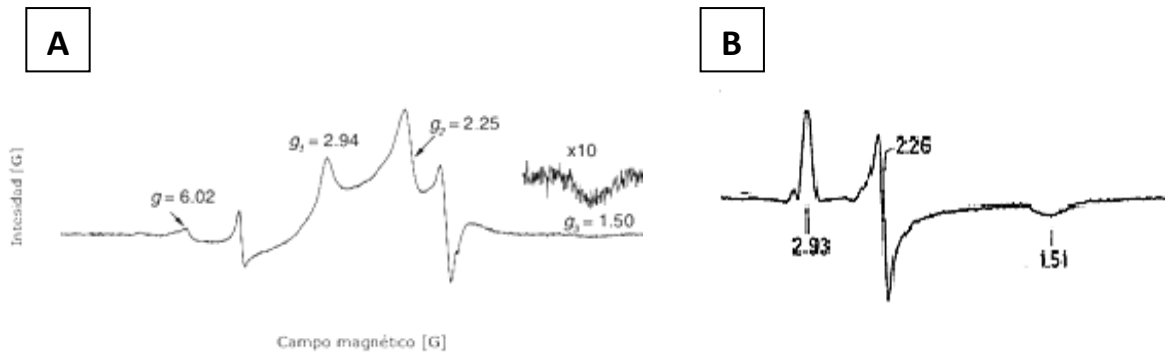


Figura 4.28. Espectros de EPR prototipo de hemos de bajo espín de Tipo II. **(A)** EPR de hemo c de bajo espín oxidado de la especie *Geobacter sulfurreducens* con valores $g_1=2.94$, $g_2=2.25$ y $g_3=1.50$, **(B)** EPR de hemo c de bajo espín oxidado de la especie *Desulfovibrio baculatus* con valores $g_1=2.93$, $g_2=2.26$ y $g_3=1.51$.

Para grupos hemos de bajo espín rómbicos de tipo II, se utilizó el análisis entre valores de g y los parámetros de campo ligante, basado en el formalismo introducido por Griffith¹⁰⁵ y desarrollado por Taylor¹⁰⁶, analizando las señales anisotrópicas para determinar los valores de rombicidad V/Δ y el campo tetragonal Δ/λ .

$$\frac{V}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_y}{g_z - g_x}$$

$$\frac{\Delta}{\lambda} = \frac{g_x}{g_z + g_y} + \frac{g_z}{g_y - g_x} - \frac{V}{2\lambda}$$

Para este análisis se tomaron en cuenta solamente los grupos hemo de bajo espín de Tipo II, ya que son los únicos que cuentan con una señal rómbica obteniendo los siguientes resultados:

¹⁰⁵ Griffith J. S. (1957). Binding in Hæmoglobin Azide as Determined by Electron Resonance: Theory of Electron Resonance in Ferrihæmoglobin Azide. *Nature*. 180, pp 30-31.

¹⁰⁶ Taylor C. P. S. (1977). The EPR of low spin heme complexes. Relation of the t_{2g} hole model to the directional properties of the g tensor, and a new method for calculating the ligand field parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*. 491. pp 137-149.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HEMO C	SUB UNIDAD	POTENCIAL REDOX	ESTADO DE ESPÍN	TIPO DE HEMO C	SEÑALES	$\frac{V}{\lambda}$	$\frac{\Delta}{\lambda}$	$\frac{V}{\Delta}$
cll ₂	SUII	+185 mV	1/2	Tipo II bajo espín	Rómbica g _x =2.974 g _y =2.289 g _z = 1525	1.86	3.25	0.58
cll ₃	SUII	+210 mV	1/2	Tipo II bajo espín	Rómbica g _x = 2.684 g _y = 2.105 g _z = 1.428	1.97	3.28	0.60

De acuerdo a los valores obtenidos mediante el tratamiento de Taylor se puede constatar la distribución rómbica (V/Δ) que existe en estos dos grupos hemo de Tipo II que oscila en un intervalo de 0,25 a 0.64, tal como lo muestra la Figura 4.8.12. Con este tratamiento de datos podemos corroborar la importancia del tipo de residuo de aminoácido que está coordinado al Fe del grupo hemo para determinar el tipo de estructura, en este caso se trata de dos histidina axiales.

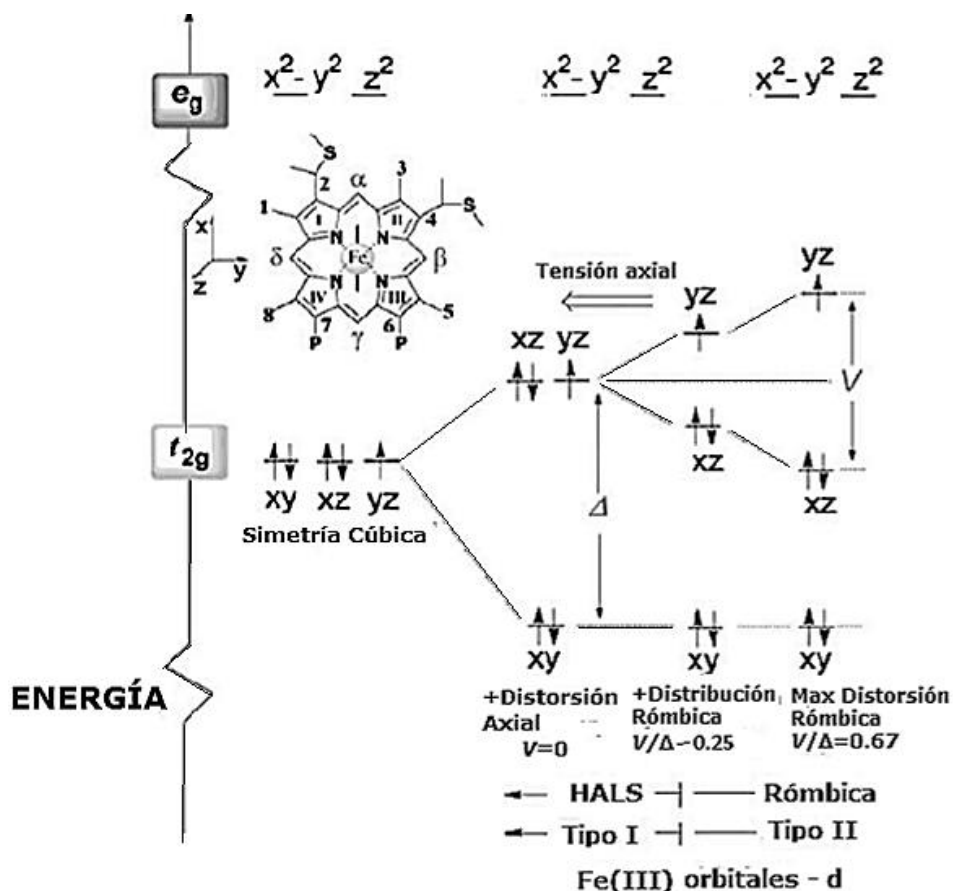


Figura 4.29. Diagrama de energía del nivel de los orbitales d para ion hierro (III) de bajo espín (d_{xy})² (d_{xz})² (d_{yz})² con ocupación orbital. Tenga en cuenta que los orbitales de hierro e_g están ocupados cuando hay un alto espín y un espín intermedio en el sistema. La posición de la histidina axial se muestra en el boceto mediante una línea negra sólida en el núcleo de porfirina orientada a lo largo del eje meso $\alpha - \gamma$. El residuo de metionina no se representa para mayor claridad¹⁰⁷

En resumen podemos proponer que los grupos hemo de bajo espín descritos con anterioridad cl_1 , cl_2 y cl_3 se encuentran dentro de la SUII de la enzima PQQ-ADH, participando directamente en la cadena de transporte de electrones, en donde los valores de $E^{\circ'}$ determinan la dirección del flujo y la fuerza de accionamiento de cada etapa de la transferencia de electrones.¹⁰⁸

En la Tabla 4.2 se hace un resumen de las señales obtenidas por RPE para cada grupo hemo analizado.

¹⁰⁷ Zoppellaro G., Harbitz E., Kaur R., Ensign A., Bren K.L. and Andersson K. (2008). Modulation of the Ligand-Field Cytochrome *c* Mutants derived from *Pseudomonas aeruginosa* Cytochrome *c*-552: A Nuclear Magnetic Resonance and Electron Paramagnetic Resonance Study. *Journal of America Chemical Society*. 130, pp 15348-15360.

¹⁰⁸ Battistuzzi G., Borsari M. and Sola M. (2001). Redox properties of Cytochrome *c*. *Antioxidants & Redox signaling*. 3 (2), pp 279-291.

Tabla 4.2. Resumen de caracterización de cada uno de los grupos hemo tipo c de la enzima PQQ-ADH.

HEMO c	SUB UNIDAD	POTENCIAL REDOX	ESTADO DE ESPÍN	TIPO DE HEMO C	SEÑALES
Ci	SUI	-64 mV	5/2	Alto espín	Rómbica $g_x=10.389$ $g_y=5.058$ $g_z=4.276$
cl ₁	SUII	-8 mV	1/2	Tipo I bajo espín	Axial $g_{max}=3.753$ $g_{min}=1.159$
cl ₂	SUII	+185 mV	1/2	Tipo II bajo espín	Rómbica $g_x=2.974$ $g_y=2.289$ $g_z=1525$
cl ₃	SUII	+210 mV	1/2	Tipo II bajo espín	Rómbica $g_x=2.684$ $g_y=2.105$ $g_z=1.428$

Para finalizar, el análisis del espectro de la PQQ-ADH oxidada (Figura 4.8.8) se notan, la señal isotrópica característica al radical PQQ•, notando una baja en intensidad de la señal indicándonos una oxidación parcial con $g_{iso} = 2.001$. Se puede constatar que la señal perteneciente al a cúmulo [2Fe-2S] desaparece debido a su completa oxidación.

El último análisis realizado fue de una muestra de enzima PQQ-ADH (21 mg/mL) (Figura 4.30) almacenada a una temperatura de 77 K durante 12 meses, esta muestra no fue manipulada con algún oxidante.

En este espectro podemos identificar una señal rómbica característica al grupo hemo de alto spin (cl) con $g_x = 10.147$, $g_y = 5.344$ y $g_z = 4.299$ ubicado en la SUI. También se observa con claridad la señal en $g_{max} = 3.872$, $g_{min} = 1.438$ perteneciente al grupo hemo de bajo spin altamente anisotrópico (cl₁) perteneciente a la SUII. En cuanto al hemo cl₂ se puede destacar solo una señal muy débil en $g_1 = 2.873$. No se observa ninguna otra señal. Para poder observar las señales del hemo cl₃ se necesita de un oxidante más fuerte ya que el potencial redox de estos grupos es muy positivo (+185 y +210 mV).

Interesantemente, aún se puede apreciar la señal isotrópica perteneciente al radical PQQ• $g_{iso} = 2.002$ y de igual forma, una señal muy débil, pero aun presente del cúmulo [2Fe-2S] con $g_{clus} = 1.926$ y $g_{clus} = 1.863$.

Analizando el las señales localizadas a campo magnético [G] superior a los 5500 gauss las asignamos a señales de oxígeno condensado perteneciente al ambiente en el cual se fue oxidando la muestra por el largo tiempo de almacenamiento.

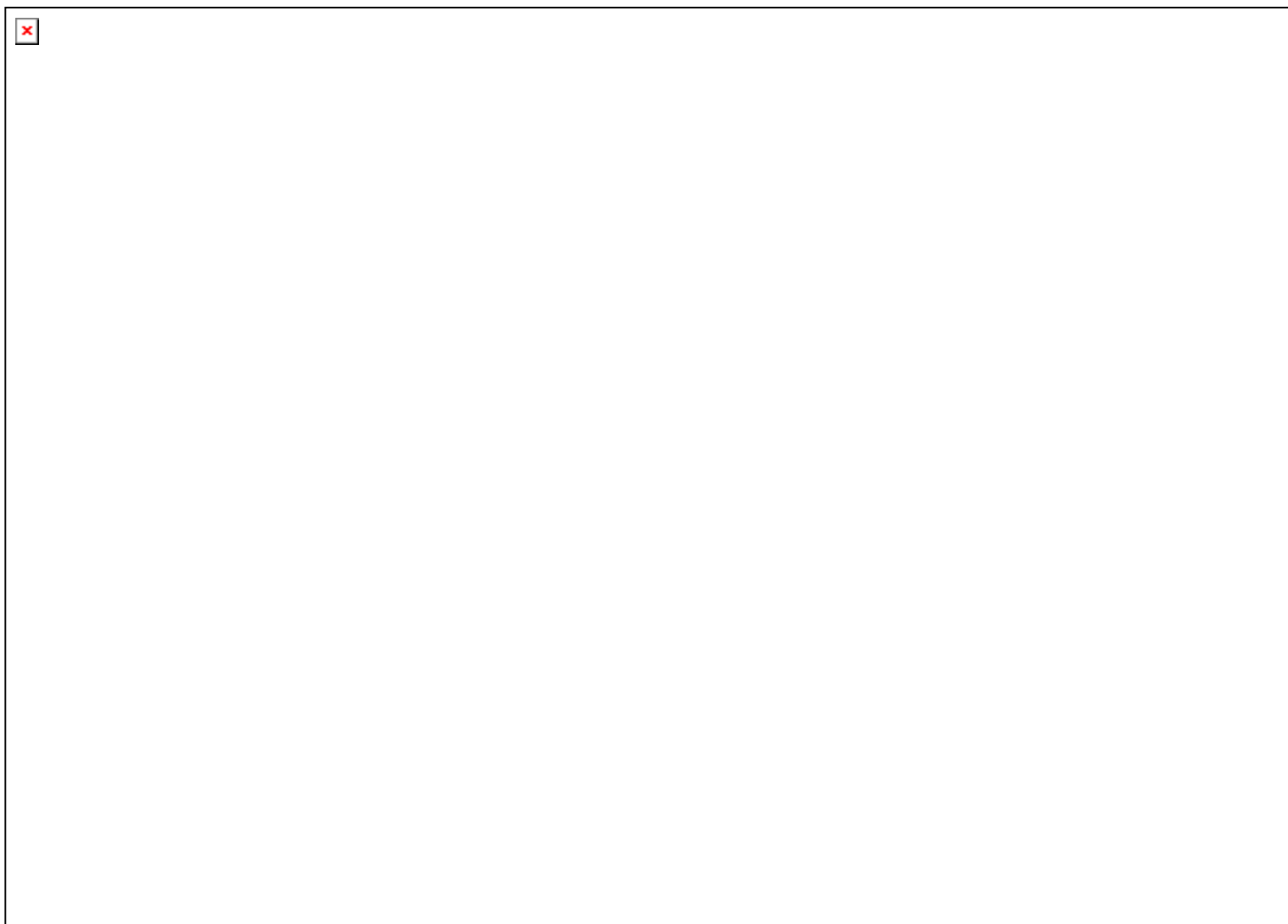


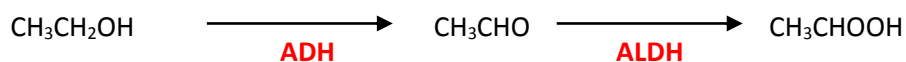
Figura 4.30. Espectro de EPR de la enzima pura PQQ-ADH de *Ga diazotrophicus* oxidada por el paso del tiempo. Condiciones: Modo perpendicular a 4K; concentración de 21 mg/mL; potencia de 2 mW; frecuencia de 9.397002 GHz.

CAPÍTULO 5

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El crecimiento de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* se inició a partir de un liofilizado que se inoculó en el medio de cultivo LIGP en estado líquido en pequeña escala para poder cerciorarnos de la buena reproducibilidad, en este proceso pudimos mejorar la sobre expresión de la enzima PQQ-ADH en su forma activa y pura. El procedimiento experimental fue modificado a lo ya reportando en la literatura y por el grupo de trabajo.

La técnica desarrollada a pequeña escala nos fue de ayuda para tener un mayor control al escalarlo a nivel industrial, realizándolo en un bioreactor con capacidad de 350 L, el factor con prioridad a controlar fue el pH que se mantuvo en un intervalo de 5.5 a 7, en este intervalo nos aseguramos que el ácido acético liberado en el medio no afectara la actividad de la enzima ya que es el producto de reacción.



Se realizaron cambios en la purificación, disminuyendo el flujo de elución y eliminando el gradiente de NaCl en las dos primeras columnas (QAE Y DEAE), esto nos permitió una mejor separación de la enzima de interés.

La actividad se logró incrementar con referencia a lo ya reportado^{109,110,111} a 293.3 unidades/mg por la técnica de ferricianuro reductasa. Esto nos indica que la enzima aislada y purificada se encuentra en óptimas condiciones de pureza y actividad.

Al obtener la enzima pura y concentrada, se realizó un gel desnaturalizante observando claramente que la enzima se disocia en dos subunidades, siendo la primera banda cercana a 72

¹⁰⁹ Matsushita, K., Takiki, E., Shinogawa, M., Ameyama, O. and Adachi, O. (1992). Ethanol oxidase respiratory chain of acetic acid bacteria. Reactivity with ubiquinone of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase purified from *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter suboxydans*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 56, pp 304-310.

¹¹⁰ Matsushita, K., Yukushi, T., Takaki, Y., Toyama, H. and Adachi, O. (1995). Generation mechanism and purification of an inactive from convertible in vivo to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology*. 177, pp 6552-6559.

¹¹¹ S. Gómez-Manzo, A. Solano-Peralta, J. P. Saucedo-Vázquez, J. E. Escamilla-Marván, P. M. H. Kroneck and M. E. Sosa-Torres. (2010). The Membrane-Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry*. 49, pp 2409-2415.

KDa que se asignó a la primera subunidad (SUI) y otra banda cercana a 44 KDa que se asignó a la segunda subunidad (SUII).

La enzima PQQ-ADH se aisló pura y en estado reducido con éxito, a una concentración de 10 mg/mL. Se empleó espectroscopia UV-vis en donde pudimos corroborar la presencia de bandas características de dos grupos prostéticos PQQ con máximas en 313 y 350, y hemos tipo c con máximas en 417 siendo esta la banda Soret, 523 y 554. Con esta información se obtuvo el coeficiente de absortividad molar para la banda β (máximo en 554 nm) siendo de $782 \text{ Mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$, este hace una corrección al ya reportado con anterioridad para esta enzima.

Siguiendo con el análisis espectroscópico, se hizo uso de la técnica de EPR para caracterizar los grupos prostéticos de esta enzima en su totalidad tanto en estado reducido como en estado oxidado.

En estado reducido, se pudieron caracterizar una señal rómbica asignada al cúmulo $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ con valores de $g = 1.930$ y $g = 1.911$, también una señal isotrópica asignada al radical PQQ^\bullet con $g = 2.004$. En cuanto a los grupos hemo tipo c de bajo espín no se espera señal ya que son espacios diamagnéticos. Los grupos hemo de alto espín en su forma reducida no se hacen presentes ya que son señales silenciosas en RPE.

Para determinar los potenciales redox de cada hemo tipo c perteneciente a la enzima PQQ-ADH se realizó una curva de titulación redox, utilizando una mezcla de quinonas como amortiguadores redox. Como agente titulante se utilizó una solución de $\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ monitoreado a una longitud de onda 553 nm. Obteniendo 4 puntos de inflexión pertenecientes a cada uno de los grupos hemo existentes en la enzima PQQ-ADH siendo los siguientes: $\text{cl} = -64 \text{ mV}$, $\text{clI}_1 = -8 \text{ mV}$, $\text{clI}_2 = +185 \text{ mV}$ y $\text{clI}_3 = +210 \text{ mV}$. De cada potencial obtenido se tomaron alícuotas que fueron analizadas por EPR con el fin de caracterizar cada hemo tipo c y poder individualizar las señales que pudiéramos apreciar en los distintos puntos de inflexión.

La primera alícuota analizada fue para el cl con potencial de -64 mV , en esta podemos asignar una señal rómbica característica de un hemo tipo c de alto espín, con señales en $g_1 = 10.855$, $g_2 = 6.029$ y $g_3 = 4.259$.

Pasando a la segunda alícuota correspondiente al clI_2 con potencial de -8 mV , que se asigna a una señal anisotrópica con $g_x = 3.935$. En este espectro se aprecia la señal del oxidante en la cual se encuentra montada la señal de interés clI_1 dificultando la caracterización.

Al realizar el espectro de EPR para los dos siguientes grupos de inflexión cl_2 y cl_3 con potenciales +185 mV y +210 mV respectivamente, fue de difícil interpretación ya que se hace presente con mayor intensidad la señal del agente oxidante ($K_4[Fe(CN)_6]$) y se hacen notar señales de las quinonas usadas como amortiguador redox ocultando las señales de interés, por este motivo se decidió iniciar otro experimento en el cual se realizara la oxidación de la enzima con otro agente que no generara señal alguna que pudiera interferir en la medición.

Los valores obtenidos de potencial redox para los grupos hemo tipo c pertenecientes a la enzima PQQ-ADH de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, son corroborados con enzimas ADH-PQQ de diferentes bacterias ácido acéticas con características similares a la estudiada en este trabajo, tales como: *Gluconacetobacter xylius* se reportan los siguientes potenciales redox de los grupos hemo tipo c $cl_1 = -34$ mV, $cl_2 = -6$ mV, $cl_3 = +180$ mV y $cl_4 = +344$ mV¹¹², *Acetobacter methanolicus* se reportan $cl_1 = -130$ mV, $cl_2 = -49$ mV, $cl_3 = +188$ mV y $cl_4 = +188$ mV¹¹³, y para la bacteria *Gluconobacter suboxydans* se muestran los valores $cl_1 = -101$ mV, $cl_2 = +216$ mV, $cl_3 = +370$ mV y $cl_4 = +401$ mV¹¹⁴, esta última difiriendo un poco en cuanto al valor de los potenciales redox de los hemos tipo c pero corroborando la presencia de los 4.

Para un nuevo experimento, se hizo uso de tert-BUOOH (10 mg/mL) como agente oxidante, se pudo observar una señal rómbica perteneciente a un grupo hemos de alto espín ($S=3/2$) con $g_x=10.389$, $g_y=5.058$ y $g_z=4.276$, proponiendo con esta un primer grupo hemo tipo c el cual se encuentra en la primera subunidad siendo el de más bajo potencial (-64 mV). Se le atribuye una coordinación octaédrica por el anillo de porfirina y dos residuos de aminoácido, una histidina y una metionina.

La siguiente señal caracterizada se atribuye a un grupo hemo de Tipo I o (HALS) mejor conocido como de bajo espín altamente anisotrópico o de bajo espín axial ($S=1/2$), asignado al segundo potencial (+8 mV), con una señal de resonancia en $g_{max} = 3.753$ otra $g_{min} = 1.159$,

¹¹² Chávez-Pacheco. J. L., Contreras-Zentella. M., Membrillo-Hernandez. J., Arreguín-Espinoza. R., Mendoza-Hernandez. G., Gomez-Manzo. S. and Escamilla. J. E. (2010). The quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter xylinus*: molecular and catalytic properties. *Archives Microbiology*. 192, pp 703-713.

¹¹³ Frébortová. J, Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Adachi O. (1997). Quinoprotein alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: kinetic study on the enzyme purified from *Acetobacter methanolicus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 61, pp 459–465.

¹¹⁴ Torimura M, Kano K, Ikeda T, Ueda T. (1997). Spectroelectrochemical characterization of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Chemistry Letters*. pp 525–526.

coordinado al anillo de porfirina y a dos residuos de aminoácido, uno de histidina y uno de metionina, haciendo una estructura hexaédrica.

Las dos últimas señales se asignaron a dos grupos hemo tipo c de bajo espín ($S=1/2$), con potenciales redox de cII_2+185 mV y cII_3+210 mV estos coordinados a al anillo de porfirina y por igual a dos residuos de aminoácidos en este caso histidina por esta razón se les nombra de Tipo II viéndose en el espectro de EPR señales rómbicas con $g_x= 2.974$, $g_y =2.284$ y $g_z = 1.524$ (cII_2) y $g_x= 2.684$, $g_y= 2.104$ y $g_z= 1.428$ (cII_3). La rombicidad de estas dos señales fue corroborada bajo el análisis propuesto por Taylor obteniendo para el cII_2 un valor de $V/\Delta=0.58$ y para cII_3 un valor de $V/\Delta=0.60$.

El último análisis realizado para este trabajo, fue una medición en EPR de una muestra de enzima PQQ-ADH a una concentración de 21 mg/mL que se almacenó a 77 K por 12 meses.

Se pudieron apreciar claramente una señal rómbica característica al grupo hemo de alto spin (cl) con $g_x= 10.147$, $g_y= 5.344$ y $g_z= 4.299$ ubicado en la SUI. En cuanto a los hemos ubicados en la SUII solo se vio la presencia de la señal característica al primer hemo tipo c de bajo espín de Tipo I (cII_1) $g_{\text{max}} = 3.872$, $g_{\text{min}}= 1.438$. En cuanto a las dos señales de los otros hemos Tipo II de bajo espín únicamente se destaca una señal que es asignada al cII_2 $g_x =2.873$ las señales faltantes a este grupo y la señal del cII_3 no se logran apreciar por la lenta cinética de reacción que realiza el O_2 atmosférico.