

Revista Latinoamericana de Microbiología

Volumen **46**
Volume

Número **1-2**
Number

Enero-Junio **2004**
January-June

Artículo:

Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Asociación Mexicana de Microbiología, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)

Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas

Marcos Flores-Encarnación,* Mariano Sánchez-Cuevas,* Felipe Ortiz-Gutiérrez*

RESUMEN. La palabra “quinoproteína” se refiere a cuatro grupos de enzimas diferentes, las cuales contienen *o*-quinonas como cofactores. La quinona de pirroloquinolina (PQQ) no está unida covalentemente. El grupo PQQ es el cofactor de algunas deshidrogenasas quinoproteicas bacterianas, que incluyen a la glucosa deshidrogenasa (G-DH), alcohol deshidrogenasa (A-DH) y a la aldehído deshidrogenasa (AL-DH). Estas deshidrogenasas se localizan en el espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas. Este trabajo muestra un resumen acerca de las propiedades estructurales de las deshidrogenasas quinoproteicas, así como las funciones biológicas y los aspectos biotecnológicos más relevantes.

Palabras clave: Quinoproteína, PQQ, deshidrogenasa, *o*-quinonas, *Acetobacter*.

ABSTRACT. The word “quinoprotein” describes four groups of different enzymes which have cofactors containing *o*-quinones. Pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) is not covalently attached. PQQ is the cofactor of several quinoprotein bacterial dehydrogenases including glucose dehydrogenase (G-DH), alcohol dehydrogenase (A-DH) and aldehyde dehydrogenase (AL-DH). These dehydrogenases are located in the periplasm of Gram-negative bacteria. This report summarises the structural properties of quinoprotein dehydrogenases, such as the biological functions and biotechnological aspects more important.

Key words: Quinoprotein, PQQ, dehydrogenase, *o*-quinones, *Acetobacter*.

INTRODUCCIÓN

En la década de los 60 se consideró que ya se conocían todos los cofactores de las enzimas presentes en los organismos eucariotes, sin embargo en las bacterias había cofactores aún no estudiados. Tal fue el caso del cofactor encontrado en la enzima metanol deshidrogenasa de las bacterias metilotróficas.⁶¹ Los primeros estudios realizados mostraron que dicha enzima contenía un grupo poco común y se le confundió con una pteridina; más tarde se propuso que era una flavina.^{8,9} Finalmente, Duine *et al.*, (1980) determinaron la identidad del grupo prostético y se trató de una *o*-quinona. Esto resultó relevante porque no se tenía conocimiento de que las quinonas pudieran funcionar como cofactores. Recientemente se han descrito variados ejemplos de enzimas bacterianas que contienen quinonas y se les ha llamado “quinoproteínas o quinoenzimas”.²⁵ Entre las quinoproteínas destaca un grupo novedoso de deshidrogenasas bacterianas, abundantes en especies Gram negativas, que oxidan una amplia gama de sustratos como azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos. Este trabajo muestra un panorama general acerca de las quinoproteínas bacterianas, en especial de las PQQ-des-

hidrogenasas, destacando sus propiedades funcionales y sus posibles aplicaciones.

COFACTORES QUINOPROTEICOS

Las quinoproteínas constituyen un grupo heterogéneo de proteínas que difieren completamente de aquellas formas que dependen de los nicotín y flavín nucleótidos.⁶⁹ Las quinoproteínas utilizan cofactores *o*-quinona para convertir una gran variedad de alcoholes, azúcares y aminas en sus productos correspondientes. Se han identificado cuatro tipos de *o*-quinonas que forman parte de las quinoproteínas.^{11,27}

- 1) Quinona de pirrolo-quinolina (también conocido como grupo PQQ). Presente en un gran número de deshidrogenasas bacterianas, las cuales oxidan alcoholes, aldehídos y azúcares (Fig. 1). El grupo PQQ se sintetiza a partir de los residuos de tirosina y de ácido glutámico y es el único ejemplo de unión no covalente.
- 2) Quinona de triptofil-triptofano (grupo TTQ). Se ha detectado en amino deshidrogenasas bacterianas y se sintetiza a partir de dos residuos de triptófano.
- 3) Topa-quinona (grupo TPQ). Se ha encontrado en amino oxidasas de bacterias, levaduras y plantas y se sintetiza a partir de tirosina.
- 4) Quinona de tirosil-lisina (grupo LTQ). Se ha encontrado en amino oxidasas de células animales y se sintetiza a partir de tirosina y lisina.

* Departamento de Ciencias de la Salud. Facultad de Medicina. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP).

LAS PQQ – QUINOPROTEÍNAS

El grupo de las PQQ-quinoproteínas incluye a múltiples enzimas con actividad de deshidrogenasa, algunas oxidasas y también a ciertas descarboxilasas bacterianas.⁶¹

Deshidrogenasas. Las PQQ-deshidrogenasas oxidan una amplia variedad de alcoholes, aldehídos, ácidos orgánicos y azúcares. Están presentes en el periplasma de diferentes especies de bacterias Gram negativas. Algunas deshidrogenasas como la glucosa deshidrogenasa están unidas a la membrana citoplásmica, en tanto otras permanecen en forma soluble (Tabla 1). Las deshidrogenasas membranales poseen su sitio catalítico orientado hacia el lado periplásmico y son capaces de oxidar directamente el sustrato. Estas enzimas son importantes debido a que participan en la oxidación de sustratos desde el exterior celular y al parecer el proceso está acoplado a la cadena respiratoria y por lo tanto a la producción de ATP.^{11,55,61}

Oxidasas. Sólo se conoce un ejemplo de PQQ-oxidasa bacteriana, la metilamina oxidasa, la cual se encuentra en la bacteria Gram positiva *Arthrobacter* P1. En los hongos, la galactosa oxidasa constituye otro ejemplo de PQQ-oxidasa.⁸⁵ Estas enzimas contienen iones Cu^{2+} gracias a las excelentes propiedades quelantes del grupo PQQ.⁶¹

Descarboxilasas bacterianas. En *E. coli* se demostró la existencia de la enzima glutamato descarboxilasa, la cual contiene al grupo PQQ unido en forma covalente.²⁶

Propiedades del grupo PQQ. El grupo PQQ se obtuvo por primera vez desnaturalizando la enzima metanol deshidrogenasa.^{10,25} Muchas bacterias lo producen en grandes cantidades y lo excretan al medio. La cantidad de PQQ excretado puede variar entre 1 $\mu\text{g/ml}$ a 1 mg/ml , lo cual depende de la composición del medio de crecimiento.⁶¹ La posición C-5 del carbonilo del grupo PQQ es muy reactiva y susceptible de ataque nucleofílico (Fig. 1).¹¹ El grupo PQQ forma complejos muy estables en presencia de benzilamina, hidroxilamina, hidrazina, fenilhidrazinas y semicarbazida, lo mismo con la acetona, aminoguanidina, urea, *o*-fenilendiamina, sulfito, malonitrilo y los iones de Cu^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} . En la Fig. 2 se muestran los mecanismos de oxidación de la benzilamina por el grupo PQQ. En uno de los mecanismos, se elimina la imina y en el otro, por medio de una reacción de aminotransferasa, se producen el aldehído y la amina correspondiente. Con los ácidos fuertes, el grupo PQQ promueve la formación de una lactona interna.^{27,66,75} Se sabe que la tirosina y el ácido glutámico son los precursores del grupo PQQ; hay escasa información acerca de la vía de biosíntesis.^{86,87,91}

LAS TTQ – QUINOPROTEÍNAS

Todas las enzimas que contienen al grupo TTQ son amino deshidrogenasas solubles de localización periplásmica en las bacterias Gram negativas. El ejemplo más conocido es la metilamino deshidrogenasa (MADH) de las bacterias metilotrófi-

Tabla 1. El grupo de las PQQ-quinoproteínas incluye a múltiples deshidrogenasas y ciertas oxidasas y descarboxilasas de una gran variedad de especies Gram negativas.

PQQ- Quinoproteínas	Enzimas	Ejemplos	Referencias	
Deshidrogenasas	Metanol deshidrogenasa	<i>Methylobacterium extorquens</i> <i>Acetobacter methanolicus</i>	(9,10,13,17,18,25,94) (61,53,54,82)	
	Glucosa deshidrogenasa (membranal)	<i>Gluconobacter suboxydans</i> <i>Acetobacter acetii</i> <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	(28,30,50,64) (51,52,55) (12,29,72,78)	
	Glucosa deshidrogenasa (soluble)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	(4,14) (24,34,69,70, 89,90)	
	Etanol deshidrogenasa	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Ps. putida</i> <i>Ps. testosteroni</i>	(80)	
	Quinocitocromo-c alcohol deshidrogenasa	<i>A. acetii</i> , <i>G. diazotrophicus</i> <i>G. suboxydans</i>	(51,52) (55)	
	Aldehído deshidrogenasa	<i>Acetobacter rancens</i> , <i>A. acetii</i> <i>G. diazotrophicus</i>	(39,48)	
	Quinato deshidrogenasa	Bacterias Gram negativas	(87)	
	Metilamina deshidrogenasa	Bacterias metilotróficas	(21)	
	Oxidasas	Metilamina oxidasa	<i>Arthrobacter</i> P1	(26)
	Descarboxilasas	Glutamato descarboxilasa	<i>Escherichia coli</i>	(26)

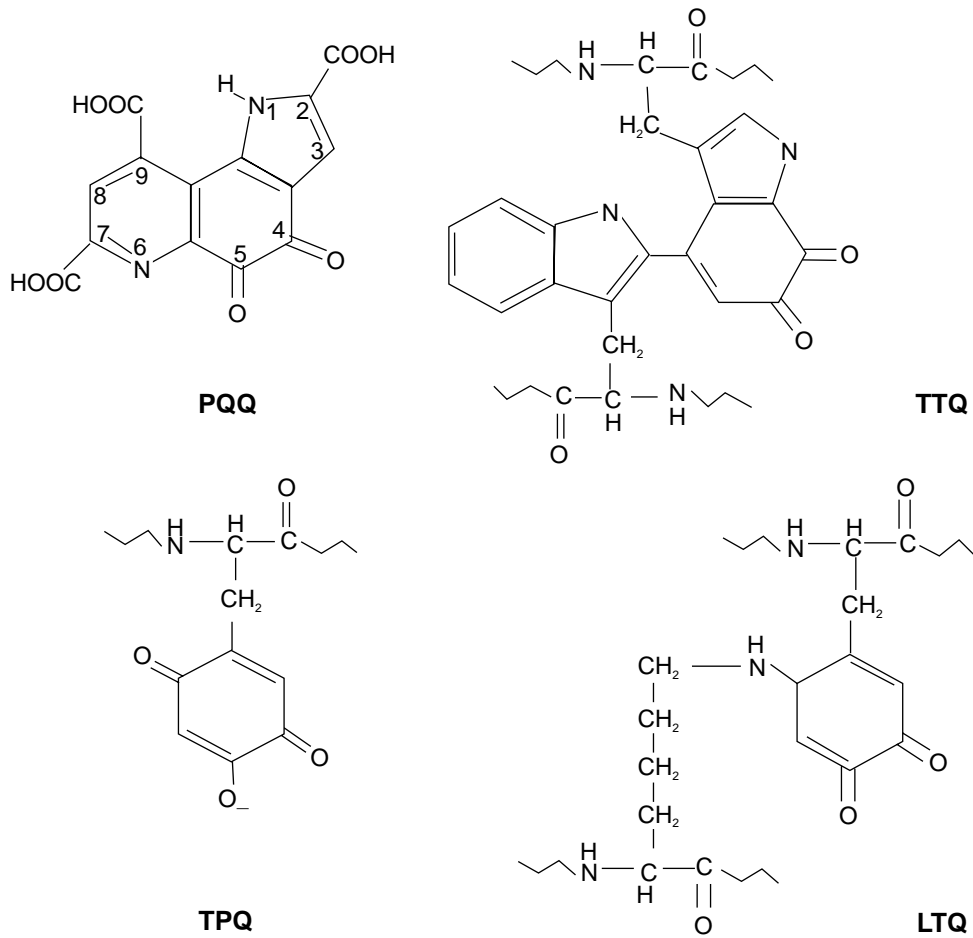


Figura 1. Estructura química de los grupos novedosos o-quinona presentes en las quinoproteínas de bacterias y de otros organismos. PQQ-quinona de pirrolo-quinolina; TTQ-quinona de triptofil-triptófano; TPQ-topa-quinona y LTQ-quinona de tiro-sil-lisina.

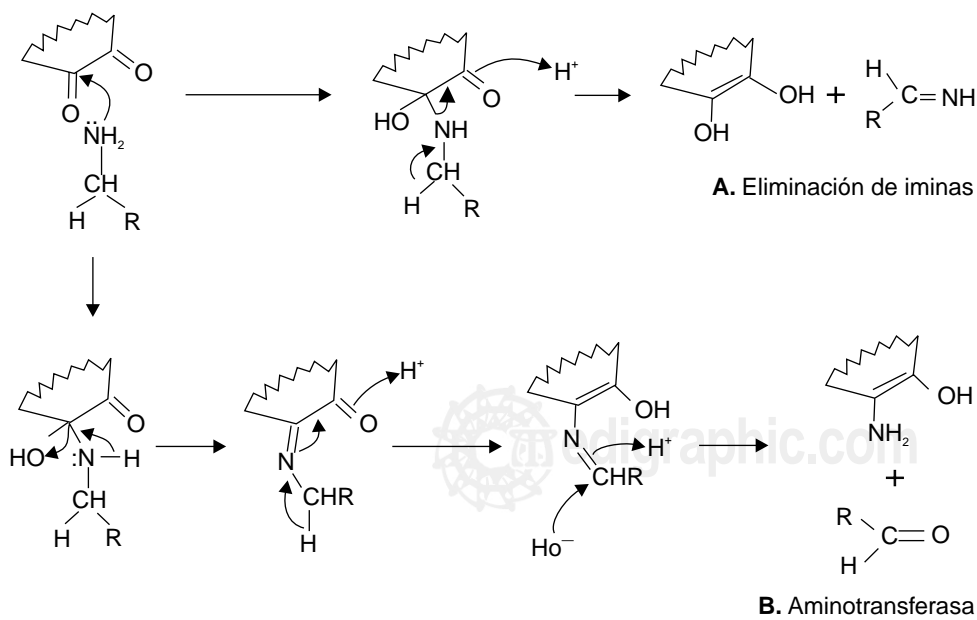


Figura 2. Mecanismos de oxidación de la benzilamina por el grupo PQQ. Las estructuras dentadas representan a la molécula del grupo PQQ. Mecanismo por eliminación de iminas (A); Mecanismo por reacción de aminotransferasa (B).

cas. Su mecanismo enzimático es de “ping-pong” como las aminotransferasas.⁵⁹ En solución acuosa, las enzimas que contienen al grupo TTQ presentan una coloración verdosa; esta propiedad determina características espectrales importantes bajo la forma reducida y oxidada. Las amino deshidrogenasas bacterianas muestran una estructura tetramérica $\alpha_2\beta_2$. La subunidad α (42-47 kDa) no contiene cofactores, tampoco residuos de cisteína. La subunidad β (8-16 kDa) contiene al grupo TTQ y presenta 12 residuos de cisteína, que permiten la formación de 6 a 7 enlaces disulfuro.⁵⁹

Propiedades del grupo TTQ. Se ha propuesto que el grupo TTQ se sintetiza a partir de dos residuos de triptófano. Como ocurre con el grupo PQQ, la benzilamina también es oxidada por TTQ debido a que el grupo TTQ es muy reactivo a los compuestos carbonilo y de amonio.⁵⁹ El TTQ posee un alto potencial medio estándar: + 100 mV a pH 7.4.

LAS TPQ – QUINOPROTEÍNAS

Las TPQ - quinoproteínas se han encontrado en bacterias Gram positivas, Gram negativas, así como en levaduras, hongos, plantas terrestres, moluscos, aves, peces, mamíferos y en el fitoplancton.^{60,77} Las TPQ-Quinoproteínas más estudiadas han sido las aminooxidasas. Todas las aminooxidasas contienen al grupo TPQ y Cu^{+2} , a excepción de la lisil oxidasa que sólo contiene Cu^{2+} (y un análogo del grupo TPQ).^{60,93} Las TPQ-quinoproteínas son enzimas solubles homodímeras (α_2) con las subunidades entrecruzadas por enlaces disulfuros. Cada subunidad α (140- 200 kDa) contiene una molécula de TPQ y un ion Cu^{2+} .⁶⁰

Propiedades del grupo TPQ. Se conoce muy poco acerca de la química del grupo TPQ. Los estudios de resonancia magnético nuclear (NMR) indicaron que el centro reactivo de este grupo se encuentra en la posición C-5.⁶² Se sintetiza *in situ* a partir de un residuo de tirosina.^{60,93} Su potencial medio estándar es de + 80 mV a pH 7.0.

LAS PQQ - DESHIDROGENASAS BACTERIANAS, PODEROSOS SISTEMAS DE OXIDACIÓN DE ALCOHOLES Y AZÚCARES

Las bacterias acéticas (especialmente las especies del género *Gluconobacter* y *Acetobacter*) y otras bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Methylobacterium* y *Arthrobacter* poseen un conjunto de PQQ-deshidrogenasas que oxidan una amplia variedad de alcoholes y azúcares.^{7,15,55,57} Muchas de ellas, se encuentran asociadas a la membrana citoplásmica y poseen su sitio catalítico orientado hacia el lado periplásmico (Fig. 3).

A. La oxidación de alcoholes. Las alcohol deshidrogenasas catalizan la oxidación de un gran número de alcoholes primarios y secundarios. A continuación se presentan las características más relevantes de ellas.

Etanol deshidrogenasa (E-DH). La E-DH se ha aislado de varios microorganismos como *Ps. aeruginosa* y *Ps. putida*. Está constituida por dos subunidades idénticas de 60 kDa y contiene dos moléculas de PQQ por mol de enzima. Los iones Ca^{2+} y Sr^{2+} son necesarios para la unión del grupo PQQ al sitio activo. La E-DH es capaz de oxidar un gran número de alcoholes primarios ($\text{C}_1 - \text{C}_{11}$), alcoholes

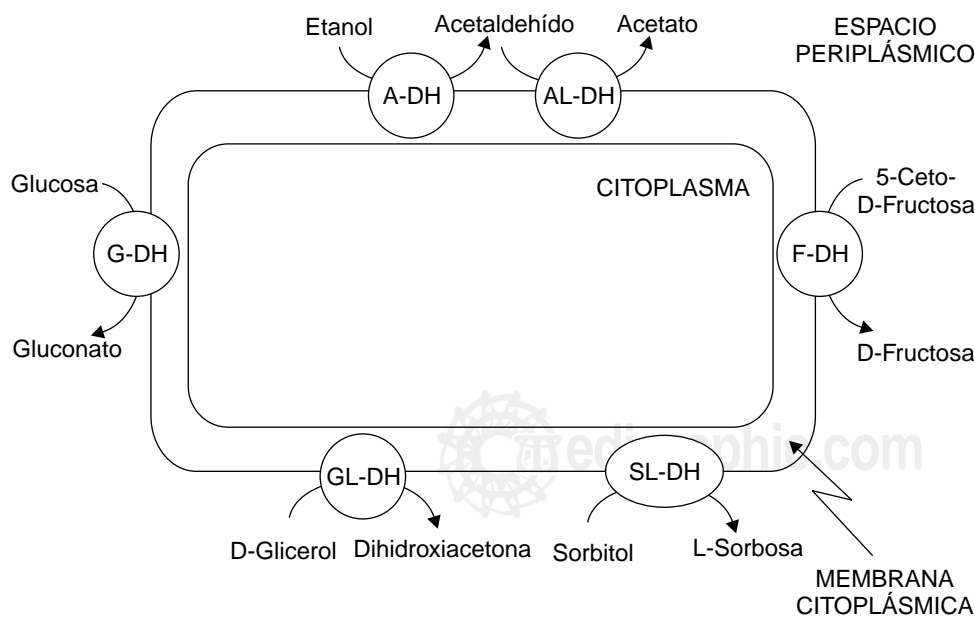


Figura 3. Poderosos sistemas de oxidación de alcoholes y azúcares presentes en la membrana citoplásmica de las bacterias acéticas y otros géneros bacterianos. La mayoría de las PQQ-deshidrogenasas tienen sus sitios catalíticos orientados hacia el espacio periplásmico. G-DH, glucosa deshidrogenasa; A-DH, alcohol deshidrogenasa; AL-DH, aldehído deshidrogenasa; F-DH, fructosa deshidrogenasa; SL-DH, sorbitol deshidrogenasa; GL-DH, glicerol deshidrogenasa.

secundarios ($C_3 - C_{10}$) y aldehídos. El metanol también es oxidado, sin embargo la afinidad de la enzima por este sustrato es baja ($K_m = 13 - 18$ mM). La E-DH tiene un pH óptimo de 9.0 a 9.5 y muestra actividad con aceptores artificiales de electrones como el metasulfato de fenazina (PMS) y el azul de Wunster (WB).⁷

Quinohemocitocromo-c alcohol deshidrogenasa (A-DH). Las A-DH catalizan la oxidación de una amplia variedad de alcoholes. Reciben este nombre debido a que contienen al grupo PQQ y uno o más moles de hemo C.² Las A-DH están presentes en las bacterias acéticas como *G. suboxydans*, *A. acetii* y *G. diazotrophicus*.^{2,29,52-55} Se ha determinado que *Ps. testosteroni* y *Comamonas testosteroni* poseen una apoA-DH soluble, la cual es inactiva porque carece del grupo PQQ; la adición exógena de PQQ en presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} restablece la actividad.^{5,61,76,79,91} Las A-DH de bacterias acéticas presentan alta especificidad por sus sustratos (alcoholes primarios de $C_2 - C_6$). El metanol y los alcoholes secundarios no son oxidados por estas enzimas.⁷ La oxidación de los alcoholes se lleva a cabo en el espacio periplásmico en un proceso acoplado a la cadena transportadora de electrones a través de la ubiquinona.^{2,3,8,9,50,55}

La A-DH de *G. suboxydans* está constituida por 3 subunidades: una de 85 kDa cuya función es de deshidrogenasa, contiene al grupo PQQ y un hemo C unido covalentemente; la segunda subunidad pesa 49 kDa y contiene tres moles de hemo C; la tercera subunidad pesa 14.4 kDa, su función se desconoce. La A-DH de *A. acetii* se compone de una subunidad de 63 kDa (con función de deshidrogenasa), otra de 44 kDa (citocromo *c*) y dos subunidades de 29 y 13.5 kDa. La función de estas últimas componentes se desconoce.⁵⁵ Las A-DH no requieren de activadores y pueden ensayarse directamente con ferricianuro, 2,6 -diclorofenolindofenol (DPIP), PMS y WB.

Aldehído deshidrogenasa (AL-DH). Se han reportado dos tipos de AL-DH: solubles (periplásmicas) y de unión a la membrana citoplásmica. Las AL-DH solubles abundan entre especies de bacterias Gram negativas, en cambio las AL-DH membranales sólo se han aislado de unas cuantas especies de *Acetobacter* y *G. suboxydans*.^{3,39,48} Las AL-DH membranales pueden oxidar aldehídos alifáticos a excepción del formaldehído; los aldehídos de $C_2 - C_4$ son los mejores sustratos.³ La enzima está localizada en la superficie externa de la membrana citoplásmica y la oxidación del aldehído está ligada a la cadena respiratoria mediante la ubiquinona. Durante la oxidación del etanol por la A-DH no se ha detectado acetaldehído, lo que ha sugerido que la A-DH y la AL-DH se encuentran formando un super-complejo enzimático destinado a la producción de ácido acético (Fig. 3).²

Metanol deshidrogenasa (M-DH). La M-DH es una proteína soluble periplásmica que cataliza la oxidación del

metanol; el producto de oxidación es el formaldehído.^{7,10,61} La M-DH puede oxidar una amplia variedad de sustratos. Los alcoholes mejor utilizados son el metanol, el etanol, el 1-propanol, el 1-butanol y los alcoholes primarios de cadena larga. La actividad de esta enzima puede ser ensayada empleando PMS y al ión amonio como activador.^{7,61}

La oxidación del metanol se lleva a cabo en el espacio periplásmico de las bacterias metilotróficas.⁶¹ En *M. extorquens*, la M-DH está unida a un citocromo de tipo *c* (Cit- c_L). El citocromo c_L funciona como aceptor fisiológico de electrones.¹⁷ En la Figura 4 se muestran los componentes del sistema respiratorio de *M. extorquens* involucrados en la oxidación de metanol. La M-DH interactúa con el citocromo c_L periplásmico soluble formando el complejo M-DH-citocromo c_L . El complejo dona electrones a las citocromo *c* oxidasas aa_3 y *co* a través de un segundo citocromo *c* (Cit- c_H). Este último parece estar unido en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica.⁷

La M-DH de *M. extorquens* ha sido una de las PQQ-deshidrogenasas que más se ha estudiado. Mediante el análisis de difracción de rayos X se llegó a conocer su estructura.^{10,11,69,95} Esta enzima presenta una estructura tetramérica ($\alpha_2\beta_2$); cada subunidad α (66 kDa) posee una molécula del grupo PQQ y un ión Ca^{2+} .^{10,68} La subunidad β (8.5-9.5 kDa) es determinante para mantener la funcionalidad de la M-DH, ya que la disociación de las subunidades α y β es irreversible lo que produce la desnaturalización de la enzima. Lo mismo ocurre cuando el grupo PQQ es removido del sitio activo.¹¹

La subunidad α de la M-DH presenta una estructura en "super-barril", lo cual es poco común entre las proteínas bacterianas.¹⁰ Curiosamente, la mitad de las proteínas con estructura en "super-barril" son enzimas, muchas de ellas de origen bacteriano como la sialidasa, fitasa, óxido nítrico reductasa, galactosa oxidasa, nitrito reductasa y algunas PQQ-deshidrogenasas como la glucosa deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, etanol deshidrogenasa, metilamino deshidrogenasa, amino deshidrogenasa y metanol deshidrogenasa.⁴³ La estructura en "super-barril" de la subunidad α de la M-DH está constituida por ocho láminas β -antiparalelas, que están ordenadas radialmente alrededor de una cavidad central, lo que asemeja a los pétalos de una flor o a las aspas de una hélice (Fig. 5). El número de láminas β -antiparalelas es variable, así por ejemplo la neuroaminidasa posee seis láminas antiparalelas, siete la galactosa oxidasa, seis la glucosa deshidrogenasa y ocho láminas antiparalelas, la metanol y la alcohol deshidrogenasas.^{10,43,61} Además de las actividades enzimáticas, las proteínas con estructura en "super-barril" parecen estar involucradas en otras funciones que incluyen la unión a ligandos, transporte, transducción de señales, inte-

racciones proteína-proteína y se les ha vinculado con algunas enfermedades como el cáncer, Alzheimer, artritis, hipercolesterolemia, retinitis pigmentosa, hipertensión y algunas infecciones microbianas y virales.⁴³

La estructura en "super-barril" actúa como un andamio que concentra las regiones proteicas funcionales (sitios catalítico y de unión del grupo PQQ) involucradas en la oxidación del sustrato.⁷¹ La base de la cavidad hidrofóbica es plana y está delimitada por un residuo de triptófano (Trp-

243), mientras que la cubierta superior está constituida por cisteínas adyacentes (Cis-103/Cis-104) que forman un doble anillo disulfuro (Fig. 6A). Las cisteínas están unidas en posición *trans* mediante un enlace peptídico no planar.^{10,18} Este es el único caso en que se ha reportado la existencia de un doble anillo disulfuro. La distancia entre S-S del anillo disulfuro es considerablemente menor que la de un enlace disulfuro típico, lo que permite mantener fuertemente unido al grupo PQQ en el sitio activo de la M-

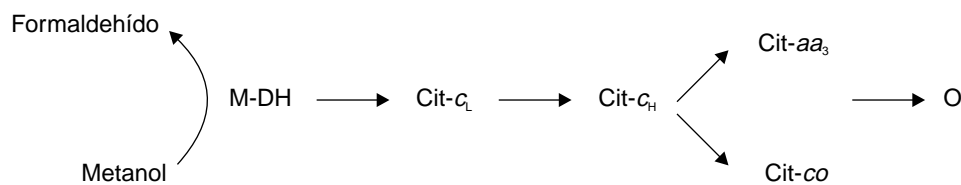


Figura 4. El sistema respiratorio de *M. extorquens* está involucrado en la oxidación del metanol. La enzima metanol deshidrogenasa (M-DH) oxida directamente al metanol e interactúa con dos citocromos de tipo c, el Cit-c_L y Cit-c_H. Los citocromo c oxidasas aa₃ y co reciben los electrones provenientes del complejo de la M-DH y reducen al oxígeno.

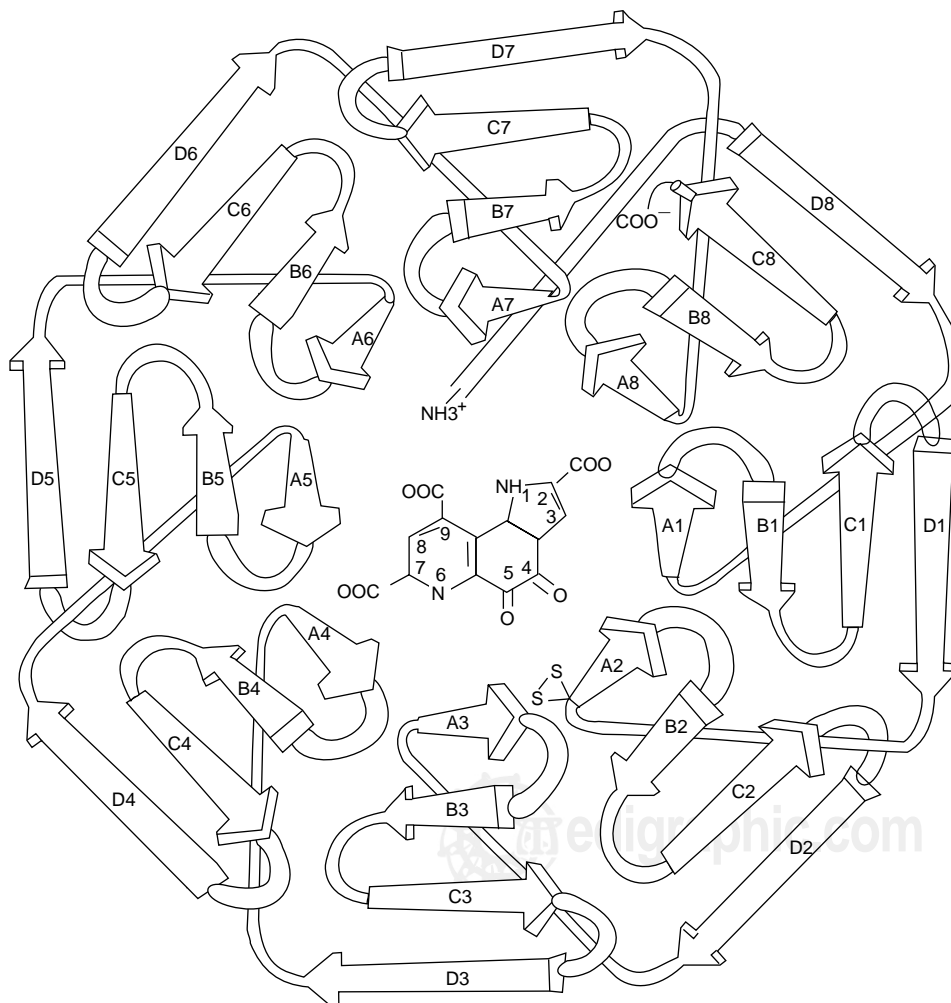


Figura 5. Estructura en "super-barril" de la subunidad α de la M-DH de *M. extorquens*. Está formada de ocho láminas A-D β -antiparalelas dispuestas con simetría radial (semejante a las aspas de una hélice). El grupo PQQ se encuentra en el centro de la cavidad hidrofóbica formada por las láminas β -antiparalelas.

DH.^{10,18} Otra función del anillo disulfuro es que participa en la transferencia de electrones desde el grupo PQQ reducido (PQQH₂) al citocromo *c*_L.¹³

En las proximidades del grupo PQQ se encuentra el ion Ca²⁺ (Fig. 7).^{13,68} El ión Ca²⁺ es esencial para mantener firme el grupo PQQ durante la oxidación del metanol; en ausencia del ion Ca²⁺ la M-DH es inactiva. Los iones divalentes como el Ca²⁺, Ba²⁺ y Sr²⁺ determinan las propiedades catalíticas de la M-DH, así la sustitución del ión Ca²⁺ por Ba²⁺ o Sr²⁺ altera el valor del *K_m* para el metanol: de *K_m* = 10 μM a *K_m* = 3.4 mM.^{10,18,31,32,73} En otras deshidrogenasas como la glucosa deshidrogenasa (G-DH) y la alcohol deshidrogenasa (A-DH), el ión Ca²⁺ también juega un papel importante para la oxidación de los sustratos.^{42,94}

Otras alcohol deshidrogenasas. La quinato deshidrogenasa (Q-DH), la polivinil alcohol deshidrogenasa (PV-DH), la polietilenglicol deshidrogenasa (PG-DH) y la glicerol deshidrogenasa (GL-DH) constituyen otros ejemplos de alcohol deshidrogenasas bacterianas.²⁹ La Q-DH y la

PG-DH parecen ser proteínas solubles, mientras que la PV-DH y la GL-DH son enzimas membranales. La GL-DH oxida el glicerol y otros alcoholes polihidroxilados como el meso-eritritol, D-arabitol, D-sorbitol, D-manitol, polietilenglicol, adonitol y dulcitol.⁶¹

B. La oxidación de azúcares. El ejemplo más estudiado es el de la PQQ-deshidrogenasa para la glucosa.

Glucosa deshidrogenasa (G-DH). La G-DH está presente en bacterias aeróbicas Gram negativas, así como en anaerobios facultativos (*Zimomonas* sp y bacterias entéricas), y en general en las bacterias con alteraciones en las vías de asimilación de glucosa.^{40,50,55,79} Forma parte de una vía alterna del sistema típico de fosfotransferasa. La G-DH cataliza la oxidación directa de la D-glucosa para producir D-gluconato.^{7,12,50,64,89} La oxidación se lleva a cabo en la superficie externa de la membrana citoplásmica de la bacteria y está ligada a la cadena transportadora de electrones.^{50,51} Se conocen dos tipos de G-DH: la membranal (G-DHm o G-DH-A) presente en *Pseudomonas* sp., *A. aceti*, *G. diazotrophicus*, *G. suboxydans*, y la forma soluble (G-DHs o G-DH-B), que sólo se ha encontrado en *A. calcoaceticus*.⁵⁵ Por otro lado, las G-DH en las que el grupo PQQ es removido empleando EDTA son de tipo I; esas deshidrogenasas se han detectado en *K. aerogenes* y *Pseudomonas* sp. En las G-DH de tipo II el grupo PQQ no es removido.^{24,30} Como ejemplos de estas últimas se tienen a las G.DH de *A. calcoaceticus*, *G. diazotrophicus* y *G. suboxydans*.^{12,72}

La G-DHm es una proteína dimérica (α_2) y pesa aproximadamente 100 kDa. Cada subunidad tiene una molécula de PQQ y un ión Ca²⁺.⁶¹ La G-DHm puede donar electrones a diversos colorantes redox y análogos de la coenzima Q.^{50,55} La G-DHs es una proteína monomérica de 83-87 kDa, posee una molécula de PQQ y un ión Ca²⁺. El aceptor natural de electrones es la coenzima Q y el sitio de unión se localiza hacia el espacio periplásmico.⁶¹

Con base en la estructura reportada para la M-DH de *M.*

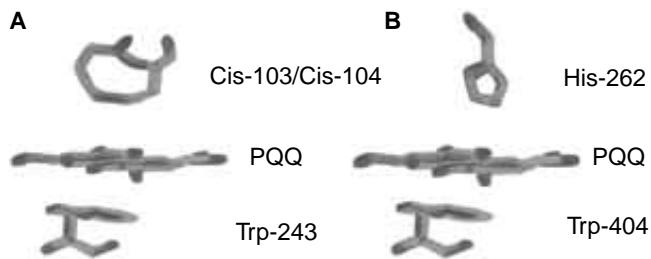


Figura 6. Disposición ecuatorial de los residuos de triptófano (Trp-243 y Trp-404), cisteína (Cis-103/Cis-104) e histidina (His-262) en las cavidades hidrofóbicas de la M-DH de *M. extorquens* (A) y la de glucosa deshidrogenasa de *E. coli* (B). El doble anillo disulfuro (Cis-103/Cis-104) y el residuo de histidina (His-262) constituyen la cubierta superior de las hendidas hidrofóbicas.

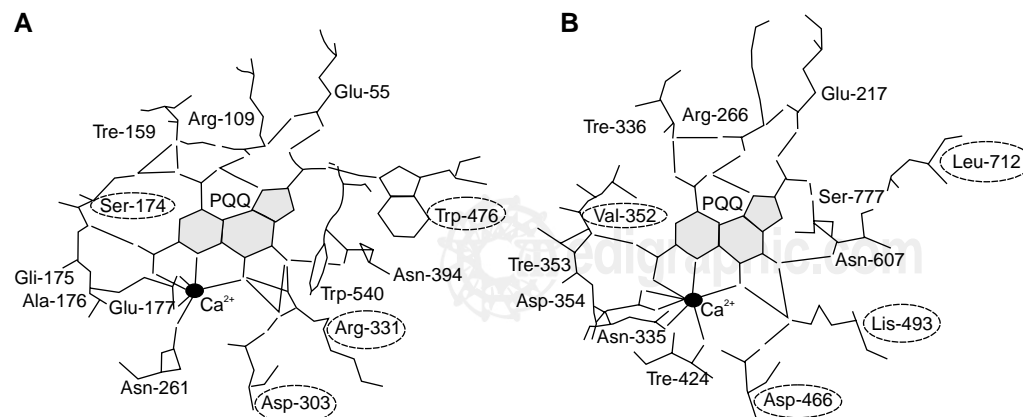


Figura 7. El ion Ca²⁺ es esencial para mantener fijo al grupo PQQ durante la oxidación del metanol y de la glucosa. A la izquierda, la representación estructural de la M-DH; a la derecha, la representación de la glucosa deshidrogenasa (G-DH). El ion Ca²⁺ se indica como una esfera ubicada en la cercanía del grupo PQQ. Las líneas discontinuas se refieren a los aminoácidos que también participan en la fijación del grupo PQQ al sitio catalítico.

extorquens se estableció la estructura de la G-DH de *E. coli*.^{18,69,70} La G-DH presenta la estructura típica de “super-barril”, pero lo más notable es la presencia de un residuo de histidina (His-262), que se encuentra en la parte superior de la hendidura hidrofóbica (Fig. 6B).¹⁸ La His-262 sustituye al doble anillo disulfuro encontrado en la M-DH de *M. extorquens* y su función es mantener unido al grupo PQQ en el sitio catalítico de la G-DH.^{18,19} Su interacción con el grupo PQQ es más débil que la que puede proporcionar el doble anillo disulfuro en la M-DH.^{13,19} Esta puede ser una de las razones por las que el grupo PQQ puede ser removido de la G-DH con mayor facilidad.^{18,19}

En *E. coli* y *Acinetobacter iwoffi* se han descrito ejemplos de apoG-DH. En estas bacterias la G-DH es inactiva, ya que la vía de síntesis del grupo PQQ está alterada. La actividad de estas deshidrogenasas puede restablecerse mediante la adición exógena del grupo PQQ.^{6,41,55,56,61} La apoenzima de la G-DH parece estar ampliamente distribuida entre las bacterias.⁷⁹

Fructosa deshidrogenasa (F-DH). La F-DH cataliza la producción de 5-ceto-D-fructosa a partir de D-fructosa.⁵⁵ Esta enzima se ha purificado y caracterizado a partir de membranas de *Gluconobacter industrius* y es específica para D-fructosa; presenta baja afinidad por sustratos análogos como la D-glucosa, D-fructosa-6-fosfato, D-fructosa-1,6-bifosfato y 5-ceto-D-fructosa. La F-DH está constituida por tres subunidades: la subunidad I pesa 67 kDa y contiene al grupo PQQ; la subunidad II pesa 20 kDa y contiene citocromo *c*; la subunidad III pesa 20 kDa y su función se desconoce. La actividad de esta enzima puede ser ensayada empleando PMS, DCIP y ferricianuro; el NAD(P)⁺ y el O₂ no son buenos aceptores de electrones para la F-DH.

IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LAS PQQ-DESHIDROGENASAS BACTERIANAS

En la industria de la fermentación, las bacterias acéticas juegan un papel muy importante porque facilitan la producción de sustancias como el vinagre, sorbitol y L-sorbose.^{7,33,55,57} Por ejemplo, la A-DH y la AL-DH de *A. aceti* y *G. suboxydans* son las enzimas responsables de la producción de ácido acético.⁵⁷ Ambas se encuentran en la membrana citoplásmica formando un super-complejo, lo cual facilita la conversión del etanol en ácido acético en un solo paso (Fig. 3).² Este modelo es sumamente interesante porque la A-DH y la AL-DH interactúan directamente con sus sustratos en el periplasma y los transforman en los productos correspondientes.^{52,53,55} El proceso se favorece porque el grupo prostético PQQ posee un alto potencial medio estándar (+ 90 mV), el cual es mucho mayor que el potencial de los nucleótidos de piridina (- 320 mV) y los nucleó-

tidos de flavina (- 45 mV). Por ello las PQQ-deshidrogenasas llevan a cabo reacciones de oxidación con gran facilidad y permiten que la respiración bacteriana sea mucho más diversa.⁵⁷ Su localización externa favorece que las PQQ-deshidrogenasas oxiden grandes cantidades de sustrato y los productos de oxidación se acumulen en el exterior de las células.^{12,40,55} Estos sistemas de oxidación benefician notablemente a la economía energética: no se requiere de ATP para el transporte de sustratos al interior de la célula puesto que los sustratos son oxidados en el exterior.⁵⁵ Además, los sistemas de oxidación están acoplados directamente a la cadena respiratoria de la bacteria, así la transferencia de electrones produce un gradiente electroquímico a través de las membranas citoplásmicas, que se usa para la generación de ATP y los procesos bioenergéticos del crecimiento celular.^{55,92}

Dentro del grupo de las bacterias fijadoras de nitrógeno, *G. diazotrophicus* se ha reconocido por su gran capacidad aerotolerante.^{29,78} Al parecer la aerotolerancia observada en *G. diazotrophicus* se atribuye en gran parte a un conjunto de PQQ-deshidrogenasas muy activas como la G-DH, A-DH y AL-DH.²⁹ Junto con las oxidasas terminales, como el citocromo *a*₁, las PQQ-deshidrogenasas constituyen un mecanismo de protección respiratoria para la nitrogenasa, donde las altas tasas de respiración detectadas en *G. diazotrophicus* permiten mantener un ambiente intracelular bajo en oxígeno, que facilita la función de la nitrogenasa.^{29,37,45} Este mecanismo de protección respiratoria es similar al descrito en *Azotobacter vinelandii* por Dalton y Postgate (1969), aunque en este último no participan las PQQ-deshidrogenasas.²⁰ Recientemente, Ureta *et al.*, (2002) describieron otro mecanismo que protege a la nitrogenasa del daño por oxígeno en *G. diazotrophicus*. Dicho modelo se basa en la protección conformacional donde muy probablemente participan las proteínas de Fe-SII Shethna.⁸³

Se conocen ejemplos de bacterias que no producen PQQ pero contienen enzimas que lo requieren como cofactor. Tal es el caso de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Rhizobium* sp.^{15,16,23,79} Estas bacterias poseen una apo-G-DH, ya que carecen de los genes que codifican para la síntesis del grupo PQQ.^{23,56,79,92}

La presencia de la apo-G-DH debe poner de manifiesto la existencia de una vía alterna para el metabolismo de la glucosa, especialmente en ambientes limitados de oxígeno y de fosfatos.^{23,56,79,92} Así en presencia de PQQ exógeno, el crecimiento de las mutantes de *E. coli* (carentes de actividad de glucocinasa y fosfotransferasa) es similar al crecimiento de la tipo silvestre.¹ La reconstitución de la apo-G-DH y de otras quinoproteínas se ha empleado para diseñar algunos ensayos enzimáticos útiles para la cuantificación de PQQ.⁸⁵

La apo-G-DH también está presente en las especies de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. El grupo PQQ es un quimio-

atrayera para los rizobios, los cuales dependen completamente de la fuente de carbono que le provee la planta huésped.^{15,16} Los ácidos C₄ - dicarboxílicos parecen ser los mejores sustratos para la fijación de nitrógeno.^{15,16,67} La presencia de la apo-G-DH en los bacteroides favorece una vía que permite la utilización simultánea de azúcares como glucosa y otras aldosas y de ácidos orgánicos si el grupo PQQ se encuentra en el medio ambiente.⁶⁷ Van Schie *et al.*, (1987) demostraron la producción de gluconato a partir de glucosa cuando *R. leguminosarum* y *R. melliloti* fueron incubados en presencia de PQQ.⁹⁰ El gluconato es metabolizado preferentemente por la vía de Entner-Doudoroff y otra porción es catabolizada por la vía del ceto-gluconato.^{15,16} Se ha propuesto que la vía extracelular y alternativa para el metabolismo de la glucosa debe beneficiar energéticamente y competitivamente a los rizobios y en general a las bacterias que cuentan con esta vía. Bajo condiciones ambientales y de limitación de nutrientes, los rizobios pueden competir con otros microorganismos para infectar y producir nódulos en la raíz de las plantas leguminosas.⁸⁸ Queda por vislumbrar el papel de la utilización de glucosa y de otros azúcares, como fuentes potenciales de energía para la fijación de nitrógeno en los bacteroides y el papel de la G-DH durante la asociación simbiótica.¹⁵

Aunque la vía biosintética del grupo PQQ no se conoce, los genes *pqq* ya han sido clonados, secuenciados y caracterizados en varios microorganismos como *Methylobacillus*, *A. calcoaceticus*, *G. oxydans*, *M. extorquens*, *Ps. fluorescens*, y *K. pneumoniae*.^{28,34,35,58,63,74,79,81,91} En *K. pneumoniae* se han encontrado y secuenciado 6 genes *pqq* (*pqqABCDEF*).⁵⁸ En *A. calcoaceticus* cinco genes (*pqqIV,V,I,II,III*) están involucrados en la síntesis de PQQ, mientras que *M. extorquens* requiere de siete genes *pqq*, tres de los cuales (*pqqD,G* y *C*) ya han sido clonados y secuenciados.^{35,63} La comparación de secuencias proteicas codificadas por cinco genes del operón *pqq* de *K. pneumoniae*, mostró homología con las proteínas codificadas por los genes *pqq* de *A. calcoaceticus* (49 a 64 % son idénticas). En *A. calcoaceticus* tres genes *pqq* codifican para proteínas cuyas masas moleculares son de 10.8, 29.7 y 43.6 kDa y se han relacionado con las enzimas de la biosíntesis.²⁸ Un cuarto gene (*pqqIV*) codifica para un polipéptido pequeño de 24 residuos de aminoácidos; la ausencia de este gene conduce a alteraciones en la vía de síntesis del grupo PQQ.⁶³ Este péptido pequeño se ha detectado en otros microorganismos como *K. pneumoniae* y *M. extorquens*. En estas bacterias los genes *pqqD* y *ppqA* codifican para péptidos de 23 y 29 residuos de aminoácidos, respectivamente. En *Methylobacillus flagellatum* el péptido consta de 24 residuos y en *Ps. fluorescens* consta de 24 – 39 residuos de aminoácidos.^{74,91} En *K. pneumoniae*, *A. calcoaceticus* y *M. extorquens* esos péptidos pe-

queños contienen residuos de ácido glutámico (Glu-15) y tirosina (Tyr-19). En *A. calcoaceticus* se ha comprobado que el Glu-15 y la Tyr-19 actúan como precursores en la biosíntesis de PQQ: la sustitución de Glu-16 por Asp y Tyr-20 por Fen en el polipéptido PqqIV produjo un bloqueo de la biosíntesis de PQQ.³⁶ La sustitución de los mismos aminoácidos en el polipéptido PqqA de *K. pneumoniae* condujo a resultados idénticos.⁵⁸

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Algunas PQQ-deshidrogenasas están involucradas en la producción de los ácidos 2-ceto-gulónico y 5-ceto-gulónico, que pueden convertirse en Vit-C. El ácido 5-ceto-gulónico se forma a partir de la glucosa e intervienen la G-DHm y la GL-DH.⁵⁷ La GL-DH también se emplea como catalizador en la producción de azúcares poco comunes como L-eritrosa y D-xilulosa a partir de meso-eritrol y D-arabitol, respectivamente.⁵⁷ Las PQQ-deshidrogenasas se han empleado como biosensores.^{22,46} La primera quinoproteína empleada fue la G-DHs la cual presentó ventajas importantes al compararse con los sistemas para glucosa dependientes de flavín y piridín nucleótidos. Los biosensores de glucosa basados en el uso de flavín nucleótidos (glucosa oxidasa) son sensibles a las fluctuaciones de oxígeno en las muestras sanguíneas, mientras que los sistemas dependientes de NAD (glucosa deshidrogenasa) son inestables debido a la pérdida del cofactor NAD. En cambio, la PQQ-G-DHs es insensible al oxígeno y tiene unido fuertemente el grupo PQQ.²² Otra ventaja importante del biosensor PQQ-G-DHs es que tiene una velocidad de respuesta más rápida y una actividad mayor que el sistema de glucosa oxidasa, por lo que se le ha empleado experimentalmente para el monitoreo de la glucosa sanguínea en pacientes diabéticos.⁵⁷ La metilamino deshidrogenasa, conteniendo el grupo TTQ se ha empleado para cuantificar las concentraciones de histamina en pacientes con leucemia mielógena crónica.⁴⁶

En el medio ambiente, las PQQ-deshidrogenasas bacterianas realizan un papel importante al solubilizar minerales como la hidroxiapatita de suelos alcalinos y desérticos. Este proceso es llevado a cabo de manera natural por medio de las bacterias ahí presentes como *Pseudomonas* sp y *Erwinia* sp., que producen ácido glucónico mediante la PQQ-G-DHm.¹⁴ La acumulación de ácido glucónico favorece la disolución de los minerales.¹⁴ Otra aplicación de las PQQ-deshidrogenasas es la de utilizarlas como bio-remediadores. Algunos estudios han puesto de manifiesto que las PQQ-A-DH degradan alcoholes xenobióticos, tanto de cadena larga como heterocíclicos y aromáticos.⁸⁰ Lo anterior da la pauta para explorar nuevos horizontes que per-

mitan combatir muchos de los males que aquejan al suelo, y en general al medio ambiente como resultado de la contaminación desmesurada en que vivimos.

Otro aspecto importante es la participación del grupo PQQ en el metabolismo del cristalino ocular. Las cataratas inducidas con hidrocortisona en embriones de pollo son reprimidas mediante la administración de PQQ, lo que sugiere que el grupo PQQ puede evitar la formación de cataratas.^{7,44,62,65} Se ha propuesto que las cataratas son producidas por la acumulación de sustancias quinoides y de polioles como dopaquinona y sorbitol y esto puede evitarse mediante el uso de PQQ que inhibe a las enzimas que forman los compuestos anteriores: tirosinasa y aldosa reductasa, respectivamente. Los valores de K_i son: K_i de 0.7 mM para la tirosinasa y de 0.3-5.0 mM para la aldosa reductasa.⁴⁴ Sin duda que el grupo PQQ debe desempeñar un papel importante en el metabolismo del cristalino. Su uso permitiría resolver graves problemas relacionados con la visión de muchas personas que padecen de este mal. Mientras tanto deben de realizarse más estudios que enriquezcan el conocimiento en este campo.

Existen algunos trabajos referentes a la participación del grupo PQQ como secuestrador de radicales libres. Matsumoto *et al.*, (1988) determinaron que la mortalidad de ratas producida por una endotoxina de *E. coli* disminuyó considerablemente después de la administración exógena de PQQ.⁴⁹ La endotoxina de *E. coli* genera aniones superóxido que dañan las membranas celulares y producen coagulopatía intravenosa diseminada. En este caso el grupo PQQ actúa como un secuestrador de radicales libres, lo que reduce considerablemente la mortalidad en las ratas. Hamagishi *et al.*, (1989) proporcionaron más evidencias de que el grupo PQQ reprime la producción de radicales superóxido que fue inducida mediante la administración intraperitoneal de sustancias químicas, o bien por reacción enzimática con la xantina oxidasa.³⁸

CONCLUSIONES

Los datos generados en las dos últimas décadas proporcionaron los elementos necesarios para integrar a la lista de óxido-reductasas, a las quinoproteínas y sus cofactores, las cuales participan en las reacciones de oxidación, reducción y desaminación. A diferencia de las enzimas piridín y flavín-dependientes, las quinoproteínas poseen cofactores derivados de *o*-quinonas. Estos compuestos proporcionan un alto potencial medio estándar a las quinoproteínas, mientras que la reactividad del carbonilo determina su participación en múltiples reacciones.

Las quinoproteínas están presentes en una amplia variedad de bacterias; destacan las PQQ-deshidrogenasas de las enterobacterias y de las bacterias acéticas. En ambos grupos, las PQQ-deshidrogenasas constituyen verdaderos sis-

temas de oxidación extracelular de alcoholes y de azúcares. Las bacterias acéticas acumulan grandes cantidades de productos oxidados, lo que permite emplearlas como poderosos sistemas biotecnológicos de fermentaciones oxidativas. Los productos obtenidos por estas vías son muy variados como el ácido glucónico, ácido 5-ceto-glucónico, ácido 2-ceto-glucónico, L-sorbosa, ácido acético y algunos azúcares poco comunes como la L-eritrosa y la D-xilulosa. A partir de los mecanismos catalíticos de las PQQ-deshidrogenasas y de la transferencia de electrones, se han diseñado sistemas enzimáticos que funcionan como biosensores; uno de los más empleados es el de glucosa. El biosensor para glucosa PQQ-dependiente se emplea para cuantificar glucosa en líquidos corporales. Así las tecnologías que se basan en el uso de piridín y flavín-nucleótidos podrán ser reemplazadas por los sistemas PQQ-dependientes que son más eficientes.

Las PQQ-deshidrogenasas involucradas en la solubilización de minerales podrían encontrar otra valiosa aplicación en la eliminación del sarro, que genera deterioro y obstrucción de tuberías, depósitos de agua, drenajes y fuentes de calentamiento. La obstrucción de conductos por sarro es un serio problema para la industria y se traduce en grandes pérdidas económicas.

El conocimiento acerca de las quinoproteínas poco a poco se ha ido diversificando, sin embargo aún falta mucho por conocer, especialmente de los mecanismos de regulación de las PQQ-deshidrogenasas y de la vía de biosíntesis del grupo PQQ. Finalmente, debido a la necesidad cada vez mayor de generar métodos de diagnóstico más eficientes a los problemas de salud más apremiantes, así como a la necesidad de reciclar y recuperar materiales y bioelementos valiosos, se espera que la aplicación de las PQQ-deshidrogenasas, haga prosperar en un futuro cercano el conocimiento de estas enzimas en tan importantes áreas de la actividad humana.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro mayor agradecimiento al Dr. Edgardo Escamilla del Instituto de Fisiología Celular-UNAM y al Dr. Mario Soberón del Instituto de Biotecnología-UNAM por su generosa ayuda y crítica para la elaboración de este manuscrito. Así mismo agradecemos a Carlos Martínez Pérez de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla y a Concepción Martínez Solís por su valiosa colaboración técnica.

REFERENCIAS

1. Adamowicz, M., T. Conway & K.W. Nickerson. 1991. Nutritional complementation of oxidase glucose metabolism in

- Escherichia coli* via pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase and the Entner-Duodoroff pathway. Appl. Env. Microbiol. 57:2012-2015.
- Ameyama, M. & O. Adachi. 1982a. Alcohol dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. 89, pp. 451-457. In W. A. Wood (ed). Methods in Enzymology. Academic Press In. London.
 - Ameyama, M. & O. Adachi. 1982b. Aldehyde dehydrogenase from acetic acid bacteria, membrane-bound. 89, pp. 491-497. In W. A. Wood (ed). Methods in Enzymology. Academic Press In. London.
 - Ameyama, M. & O. Adachi. 1982c. D-glucose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*, membrane-bound. 89, pp. 149-154. In W. A. Wood (ed). Methods in Enzymology. Academic Press In. London.
 - Ameyama, M., M. Nonome, M. Hayashi, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi. 1985. Mode of binding of pyrroloquinoline quinone to apo-glucose dehydrogenase. Agric. Biol. Chem. 49:1227-1231.
 - Ameyama, M., M. Nonome, E. Shinagawa, K. Matsushita, K. Takimoto & O. Adachi. 1986. Purification and characterization of the quinoprotein D-glucose dehydrogenase apoenzyme from *Escherichia coli*. Agric. Biol. Chem. 50:49-57.
 - Ameyama, M., K. Matsushita, E. Shinagawa & O. Adachi. 1991. Biochemical and physiological functions of pyrroloquinoline quinone. Vit. and Horm. 46:229-278.
 - Anthony, C. 1993a. The role of quinoproteins in bacteria energy transduction, pp. 223-244. In D.L. Davidson (ed). Principles and Applications of Quinoproteins. M. Dekker. New York.
 - Anthony, C. 1993b. Methanol dehydrogenase in gram-positive bacteria. pp. 17-45. In V. Davidson (ed). Principles and applications of quinoproteins. Dekker. New York.
 - Anthony, C., M. Ghosh, & C.C.F. Blake. 1994. The structure and function of methanol dehydrogenase and related quinoproteins containing pyrrolo-quinoline quinone. Biochem. J. 304:665-674.
 - Anthony, C. 1996. Quinoprotein-catalyzed reactions. Biochem. J. 320:697-711.
 - Attwood, M.M., P. Johannes, P. Van Dijken & J.T. Pronk. 1991. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. J. Ferment. Bioengin. 72:101-105.
 - Avezoux, A., M.G. Matthew & C. Anthony. 1995. The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. Biochem. J. 307:735-741.
 - Babu-Khan, S., T.C. Yeo, W.L. Martin, M.R. Duron, R. D. Rogers & A. H. Golstein. 1995. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. Appl. Environ. Microbiol. 61:972-978.
 - Bernardelli, C.E., M.F. Luna, M.L. Galar & J.L. Boiardi. 2001. Periplasmic PQQ-dependent glucose oxidation in free-living and symbiotic Rhizobia. Curr. Microbiol. 42:310-315.
 - Boiardi, J.L., M.L. Galar & O.M. Neijssel. 1996. PQQ-linked extracellular glucose oxidation and chemotaxis towards this cofactor in rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. 140:179-184.
 - Chan, H.T.C. & C. Anthony. 1991. The interaction of methanol dehydrogenase and cytochrome c_L in the acidophilic methylotroph *Acetobacter methanolicus*. Biochem. J. 280:139-146.
 - Cozier, G.E. & C. Anthony. 1995. Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. Biochem. J. 312:679-685.
 - Cozier, G.E., R.A. Salleh & C. Anthony. 1999. Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine. Biochem. J. 340:639-647.
 - Dalton, H. & J.R. Postgate. 1969. Effect of oxygen on grown of *Azotobacter chroococcum* continuous cultures. J. Gen Microbiol. 54:463-468.
 - Davison, V.L. 1993. Methylamine dehydrogenase. pp. 73-85. In V. Davidson (ed). Principles and applications of quinoproteins. Dekker. New York.
 - D'Costa, E.J., I.J. Higgins, A.P. Turner. 1986. Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. Biosensors. 2:71-87.
 - Dejonge, R., M.J.T. Demattos, O.M. Neijssel, J.B. Stock & O.M. Neijssel. 1996. Pyrroloquinoline quinone, a chemotactic attractant for *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 178:1224-1226.
 - Dokter, P., F. Jzn & J.A. Duine. 1986. Purification and characterization of quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Biochem. J. 239:163-167.
 - Duine, J.A., J. Frank, & P.E.J. Verwiël. 1980. Structure and activity of the prosthetic group of methanol dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 108:187-192.
 - Duine, J.A. 1989. PQQ and quinoproteins: an important novel field in enzymology. Anton van Leeuwenhoek. 56:3-12.
 - Duine, H. 1991. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrrolo-quinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. Eur. J. Biochem. 200:271-284.
 - Felder, M., A. Gupta., V. Verma, A. Kumar, N.G. Qazi & J. Cullum. 2000. The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*. FEMS Microbiol. 193:231-236.
 - Flores-Encarnación, M., M. Contreras-Zentella, L. Soto-Urzúa, G.A. Aguilar, B.E. Baca & J.E. Escamilla. 1999. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. J. Bacteriol. 181:6987-6995.
 - Galar, M.L. & J.L. Boiardi. 1995. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:713-716.
 - Goodwin, M.G. & C. Anthony. 1996. Characterization of a novel methanol dehydrogenase containing a Ba²⁺ ion at the active site. Biochem. J. 318:673-679.
 - Goodwin, M.G., A. Avezoux., S.L. Dales & C. Anthony. 1996. Reconstitution of the quinoprotein methanol dehydrogenase from inactive Ca²⁺-free enzyme with Ca²⁺, Sr²⁺ or Ba²⁺. Biochem. J. 319:839-842.
 - Goodwin, P.M. & C. Anthony. 1998. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. Adv. Microb. Physiol. 40:1-80.
 - Goosen, N., D.A.M. Vermass & P. Van Deputte. 1987. Cloning of the genes involved in synthesis of coenzyme pyrroloquinoline-quinone from *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 169:303-307.
 - Goosen, N., H.P. Horsman, R.G. Huine & P. Van Deputte. 1989. *Acinetobacter calcoaceticus* genes involved in biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone: nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 171:447-455.
 - Goosen, N., R.G. Huine & P. Van Deputte. 1992. A 24-amino-acid polypeptide is essential for the biosynthesis of the coenzyme pyrrolo-quinoline-quinone. J. Bacteriol. 174:1426-1427.
 - Hill, S. 1988. How is nitrogenase regulated by oxygen? FEMS Microbiol. Lett. 54:111-130.
 - Hamagishi, Y., S. Murata, H. Kamei, T. Oki & M. Ameyama. 1989. Novel pharmacological activity of a novel cofactor PQQ. Radical scavenger-like activity. Abstr. Annu. Meet. Jpn. Pharmacol. Soc., 109 th. pp. 42.
 - Hommel, R. & H.P. Kleber. 1990. Properties of the quinoprotein aldehyde dehydrogenase from *Acetobacter rancens*. J. Gen. Microbiol. 136:1705-1711.
 - Hommel R.W. J., B. Van Hell, P.W. Postma, O.M. Neijssel & D.W. Tempest. 1985. The functional significance of glucose

- dehydrogenase in *Klebsiella aerogenes*. Arch. Microbiol. 143:163-168.
41. Iswantini, D., K. Kano & T. Ikeda. 2000. Kinetics and thermodynamics of activation of quinoprotein glucose dehydrogenase apoenzyme *in vivo* and catalytic activity of the activated enzyme in *Escherichia* cells. Biochem. J. 350:917-923.
 42. Itoh, S., H. Kawakami & S. Fukuzumi. 1998. Model studies on calcium-containing quinoprotein alcohol dehydrogenases. Catalytic role of Ca²⁺ for the oxidation of alcohols by coenzyme PQQ (4,5-dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid). Biochem. 37:6562-6571.
 43. Jawad, S. & M. Paoli. 2002. Novel sequences propel familiar folds. Struct. 10:447-454.
 44. Katsumata, M., Y. Ohsawa, C. Nakagiri & S. Nakano. 1988. Anticataract agent. Jpn. Pat. 63:41421-41425.
 45. Kim, J. & D. Rees. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. Biochemistry. 33:389-397.
 46. Loughran, M.G., J.M. Hall, A.P. Turner & V.L. Davidson. 1995. Amperometric detection of histamine at a quinoprotein dehydrogenase enzyme electrode. Biosens. Bioelectron. 10:569-576.
 47. Maccarrone, M., G.A. Veldink & F.G. Vliegthart. 1991. An investigation on the quinoprotein nature of some fungi and plant oxidoreductases. J. Biol. Chem. 266:21014-21017.
 48. Marison, I. W. & M.M. Attwood. 1980. Partial purification and characterization of the dye-linked formaldehyde dehydrogenase from *Hypomicrobium* X. J. Gen. Microbiol. 117:305-313.
 49. Matsumoto, T., O. Susuki, H. Hayakawa, S. Ogiso, N. Hayakawa, Y. Nimura, I. Takashi & S. Shionoya. 1988. Effects of exogenous PQQ on mortality rate and some biochemical parameters during endotoxin shock in rats. pp. 162-164. In PQQ and quinoproteins. J. A. Jongejan and J. A. Duine (eds). Kluwer. The Hague.
 50. Matsushita, K., E. Shinagawa, O. Adachi & M. Ameyama. 1989. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. J. Biochem. 105:633-637.
 51. Matsushita, K., E. Shinagawa, O. Adachi & M. Ameyama. 1990. Cytochrome *a₁* of *Acetobacter aceti* is a cytochrome *ba* functioning as ubiquinol oxidase. Proc. Natl. Sci. USA. 87:9863-9867.
 52. Matsushita, K., H. Ebisuya, M. Ameyama & O. Adachi. 1992a. Change of the terminal oxidase from cytochrome *a₁* in shaking cultures to cytochrome *o* in static cultures of *Acetobacter aceti*. J. Bacteriol. 174:122-129.
 53. Matsushita, K., K. Takahashi, M. Takahashi, M. Ameyama & O. Adachi. 1992b. Methanol and ethanol-oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic bacterium, *Acetobacter methanolicus*. J. Biochem. 111:739-747.
 54. Matsushita, K., K. Takahashi, M. Takahashi, M. Ameyama & O. Adachi. 1992c. Methanol and ethanol oxidase respiratory chains of the methylotrophic acetic acid bacterium, *Acetobacter methanolicus*. J. Biochem. 111:739-747.
 55. Matsushita, K., H. Toyama & O. Adachi. 1994. Respiratory chains and bioenergetics of acetic bacteria. Adv. Microbiol. Physiol. 36:247-301.
 56. Matsushita, K., J.C. Arents, B. Rader, M. Yamada, O. Adachi & P.W. Postma. 1997. *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). Microbiol. 143:3149-3156.
 57. Matsushita, K., H. Toyama & O. Adachi. 2002. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:13-22.
 58. Meulenberg, J.J., E. Sellink, N.H. Riegman & P.W. Postma. 1992. Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae* pqq operon. Mol. Gen. Genet. 232:284-294.
 59. McIntire, W.S., D.E. Wemmer, A. Chistoserdov & M.E. Lidstrom. 1991. A new cofactor in a prokaryotic enzyme: tryptophan tryptophylquinone as the redox prosthetic group in methylamine dehydrogenase. Science. 252:817-824.
 60. McIntire, W.S. & C. Hartmann. 1993. Copper-containing amine oxidases. pp. 97-332. In D. L. Davidson (ed). Principles and Applications of Quinoproteins. M. Dekker. New York.
 61. McIntire, W.S. Quinoproteins. 1994. The FASEB J. 8:513-519.
 62. McIntire, W.S. 1998. Newly discovered redox cofactors: possible nutritional medical and pharmacological relevance to higher animals. Ann. Rev. Nutr. 18:145-177.
 63. Morris, C.J., F. Biville, E. Turlin, E. Lee, K. Ellermann, W.H. Fan, R. Ramamoorthi, A.L. Springer & M.E. Lidstrom. 1994. Isolation, phenotypic characterization and complementation analysis of mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 unable to synthesize pyrroloquinoline quinone and sequences of pqqD, pqqG and pqqC. J. Bacteriol. 176:1746-1755.
 64. Neijssel, O.M., R.W. J. Hommes, P.W. Postma & D.W. Tempest. 1989. Physiological significs and bioenergetic aspects of glucose dehydrogenase. Anton van Leeuwenhoek. 56: 51-61.
 65. Nishigori, H., M. Yasunaga, M. Mizumura, J.W. Lee & M. Iwatsuru. 1989. Preventive effects of pyrroloquinoline quinone on formation of cataract and decline of lenticular and hepatic glutathione of developing chick embryo after glucocorticoid treatment. Life Sci. 45:593-598.
 66. Ohshiro, Y. & S. Itoh. 1993. The chemistry of PQQ and related compounds. pp. 309-341. In D.L. Davidson (ed). Principles and Applications of Quinoproteins. M. Dekker. New York.
 67. O'Gara, F.O., K. Birkenhead, B. Boesten & A.M. Fitzmaurice. 1989. Carbon metabolism and catabolic repression in *Rhizobium* spp. FEMS Microbiol. Lett. 63:93-102.
 68. Olsthoorn, A.J.J., T. Otsuki & J.A. Duine. 1997. Ca²⁺ and its substitutes have two different binding sites and roles in soluble, quinoprotein (pyrroloquinoline quinone-containing) glucose dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 247:659-665.
 69. Oubrie, A., H.J. Rozeboom, K.H. Kalk, A.J.J. Olsthoorn, J.A. Duine & B.W. Dijkstra. 1999a. Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. The EMBO J. 18:5187-5194.
 70. Oubrie, A.H., H.J. Rozeboom & B.W. Dijkstra. 1999b. Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex. Proc. Natl. Sci. USA. 96:11787-11791.
 71. Oubrie, A. & B.W. Dijkstra. 2000. Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymes. Protein Sci. 9:1265-1273.
 72. Reis, V.M. F., F.L. Olivares & J. Dobreiner. 1994. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. World J. Microbiol. Biotechnol. 10:401-405.
 73. Sato, A., T.K. Takagi, K. Kano, N. Kato, J.A. Duine & T. Ikeda. 2001. Ca²⁺ stabilizes the semiquinone radical of pyrroloquinoline quinone. Biochem. J. 357:893-898.
 74. Schneider, U., C. Keel, C. Voisard, G. Defago & D. Haas. 1995. Tn5-directed cloning of pqq genes from *Pseudomonas fluorescens* CHAO: mutational inactivation of the genes results in overproduction of the antibiotic pyoluteorin. Appl. Environm. Microbiol. 61:3856-3864.
 75. Sleath, P.R., J.B. Noar, G.A. Eberlein & T.C. Bruce. 1985. Synthesis of 7,9 -didecarboxymethoxantin (4,5 - dihydro - 4,5 - dioxo - 1H-pyrrolo - 2,3 -fquinoline-2-carboxylic acid) and comparison of its chemical properties with those methoxantin and analogous o-quinones. Model studies directed towards the action of PQQ-requiring bacterial oxidoreductases and mammalian plasma amine oxidase. J. Am. Chem. Soc. 107:3328-3338.
 76. Sode K., K. Ito, A.B. Witarto, K. Watanabe, H. Yoshida & P. Postma. 1996. Increased production of recombinant pyrroloquinoline quinone (PQQ) glucose dehydrogenase by metabolically engineered *Escherichia coli* strain capable of PQQ biosynthesis. J. Biotechnol. 49:239-243.

77. Steinebach, V., S. de Vries & J.A. Duinet. 1996. Intermediates in the catalytic cycle of copper-quinoprotein amine oxidase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 271:5580-5588.
78. Stephan, M.P., M. Oliveira, K.R.S. Teixeira, G. Martínez-Drets & J. Dobereiner. 1991. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. FEMS Microbiol. Lett. 77: 67-72.
79. Stites, T.E., E.A.E. Mitchell & R.B. Rucker. 2000. Physiological importance of quinoenzymes and the *o*-quinone family of cofactors. J. Nutr. 130:719-727.
80. Toyama, H., A. Fujii, K. Matsushita, E. Shinagawa, M. Ameyama & O. Adachi. 1995. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. J. Bacteriol. 177:2442-2450.
81. Toyama, H. & M.E. Lidstrom. 1998. PqqA is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1. Microbiol. 144:183-191.
82. Urakami, T., K. Yashima, H. Kobayashi, A. Yoshida & I.C. Yoshida. 1992. Production of pyrroloquinoline quinone by using methanol-utilizing bacteria. Appl. Environment. Microbiol. 58:3970-3976.
83. Ureta, A. & S. Nordlund. 2002. Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. J. Bacteriol. 184:5805-5809.
84. Van der Meer, R.A.B., J.A. Jongejan & J.A. Duine. 1989. Pyrroloquinoline quinone as cofactor of galactose oxidase. J. Biol. Chem. 264:7792-7794.
85. Van der Meer, R.A., B.W. Groen, M.A.G., V. Kleff, J. Frank, J.A. Jongejan & J.A. Duine. 1990. Isolation, preparation, and assay of pyrroloquinoline quinone. 188. pp. 260-283. In W.A. Wood (ed). Methods in Enzymology. Academic Press In. London.
86. Van Kleff, M.A.G. & J.A. Duine. 1988a. A search for intermediates in the bacterial biosynthesis of PQQ. Biofactors. 1:297-302.
87. Van Kleff, M.A.G. & J.A. Duine. 1988b. L-Tyrosine is the precursor of PQQ biosynthesis in *Hyphomicrobium* X. FEBS Lett. 237:91-97.
88. Van Rhijn, P. & J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol. Rev. 59:124-142.
89. Van Schie, B.J., K.J. Hellingwerf, J.P. Van Dijken, M.G.L. Elferink, J. van Dijk, J.G. Kuenen & W.N. Konings. 1985. Energy transduction by electron transfer via a pyrrolo-quinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter calcoaceticus* (var. *Iwoffii*). J. Bacteriol. 163:493-499.
90. Van Schie, B.J., O.H. De Mooy, J.D. Linton, J.P. Van Dijken & J.G. Kuenen. 1987. PQQ-dependent production of gluconic acid by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Rhizobium* species. J. Gen. Microbiol. 133:867-875.
91. Velterop, J.S., J.J.M. Sellink, M. Meulenberg, S. David, L. Bulder & P.W. Postma. 1995. Synthesis of pyrrolo-quinoline quinone *in vivo* and *in vitro* and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 177:5088-5096.
92. Yamada, M., K. Sumi, K. Matsushita, O. Adachi & Y. Yamada. 1993. Topological analysis of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* and its ubiquinone-binding site. J. Biol. Chem. 268:12821-12817.
93. Zhang, X., J.H. Fuller & W.S. McIntire. 1993. Cloning, sequencing, expression, and regulation of the structural gene for the copper/topa quinone-containing methylamine oxidase from *Arthrobacter* strain P1, a Gram-positive facultative methylotroph. J. Bacteriol. 175:5617-5627.
94. Zheng, Y.J. & T.C. Bruce. 1997. Conformation of coenzyme pyrroloquinoline quinone and role of Ca²⁺ in the catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:11881-11886.
95. Zheng, Y.J., Z.X. Xia, Z.W. Chen, F.S. Mathews & T.C. Bruce. 2001. Catalytic mechanism of quinoprotein methanol dehydrogenase: A theoretical and X-ray crystallographic investigation. Proc. Natl. Sci. USA. 98:432-434.

Correspondencia:

Dr. Marcos Flores-Encarnación
Departamento de Ciencias de la Salud.
Facultad de Medicina.
Universidad Popular Autónoma del
Estado de Puebla.
21 Sur 1103, Col. Santiago.
C.P. 72160, Puebla Pue. México.
Phone: +52 (222) 2299466,
Fax: +52 (222) 2325251.
E-mail: mflores31@hotmail.com