

Extracción y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de la bacteria carboxidótrofa *Oligotropha carboxidovorans**

Extraction and purification of the enzyme carbon monoxide dehydrogenase from the carboxidotrophic bacteria *Oligotropha carboxidovorans*, OM 5 strain

Raúl A. Cuervo

Bióloga. Profesor Tiempo Completo de la USB

Clara Hurtado

Química, magíster en Química,
Universidad del Valle.

Neyla Benítez

Bióloga, magíster en Microbiología,
Universidad del Cauca.

Enrique Bravo

Bioquímico, magíster en Ciencias,
Universidad del Valle.

Walter Torres

Químico, doctorado en Química,
Universidad del Valle.

Fernando Larmat

Químico, doctorado en Química, Universidad del Valle.

Grupo de investigación: *Biotecnología vegetal*
Universidad de San Buenaventura Cali

Resumen

En este trabajo se reporta la extracción y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de la bacteria *Oligotropha carboxidovorans*, cepa OM 5. La bacteria creció de manera autótrofa en un medio mineral, en una atmósfera saturada con monóxido de carbono, a 30 °C con agitación constante. Para la obtención de los extractos enzimáticos crudos, los cultivos se sometieron a ruptura por sonicación, solubilización con detergente no iónico y centrifugación con el fin de eliminar los restos celulares. En el proceso de purificación, los extractos enzimáticos crudos se pasaron a través de una columna de exclusión molecular y otra de intercambio iónico.

Palabras clave: *Oligotropha carboxidovorans*, extractos enzimáticos, Ecteolla celulosa, Purificación

Abstract

This paper reports the extraction and purification of the carbon monoxide dehydrogenase enzyme from the *Oligotropha carboxidovorans* bacteria, OM 5 strain. The bacteria grew autotrophically in a mineral medium, in carbon monoxide saturated atmosphere, at 30°C with constant agitation. In order to obtain the crude enzymatic extracts, the crops underwent a breakdown by sonication, solvolysis with non-ionic detergent and centrifugation to eliminate the cellular debris. During the purification process, the crude enzymatic extracts were passed through a molecular exclusion column as well as through an ion-exchange one.

Keywords: *Oligotropha carboxidovorans*, enzymatic extracts, Ecteolla cellulose, purification.

* Este informe hace parte de las investigaciones adelantadas en el grupo *Biotecnología vegetal*, registrado por Colciencias e inscrito en el Centro de Investigaciones Bonaventuriana de la Universidad de San Buenaventura Cali.

Fecha de recepción: Septiembre de 2005.

Aceptación para su publicación: Noviembre de 2005.

Introducción

El monóxido de carbono (CO) es un gas contaminante, venenoso, producido durante la combustión incompleta de materiales orgánicos (gas natural, petróleo, gasolina, carbón y materiales vegetales). El monóxido de carbono inhibe la capacidad de la sangre para transportar oxígeno, siendo responsable de síntomas como resfrío, gripa, pasando por el dolor de cabeza, náuseas e incluso la muerte (DEVLIN, 1993).

A nivel mundial hay una conciencia cada vez mayor entre las autoridades competentes de controlar los niveles de monóxido de carbono presentes en la atmósfera en el orden de partes por millón y partes por billón. Es por esto que hay un gran interés por el desarrollo de biosensores; es decir, sensores basados en principios de reconocimiento molecular inherente a muchas reacciones bioquímicas en la que participan enzimas y anticuerpos capaces de detectar concentraciones pequeñas de gas (CUNNINGHAM, et al, 1998).

Un sensor electroquímico enzimático es un electrodo metálico cuya superficie contiene una enzima redox inmovilizada. Las enzimas pueden aislarse de sus fuentes (microorganismos, tejidos vegetales o animales) y purificarse.

En la literatura científica se encuentran numerosos ejemplos de biosensores enzimáticos, generalmente para glucosa, utilizando la enzima glucosa oxidasa pura, obtenida a partir de extractos celulares de hongos como *Aspergillus niger* y *Penicillium notatum*, utilizando mediadores electrónicos como ferroceno, complejos de rutenio y quinonas (CALVO & DANILOWICS, 1997).

La bacteria Gram (-) *Oligotropha carboxidovorans* (cepa OM 5), pertenece al grupo de bacterias carboxidótrofas, que pueden usar el monóxido de carbono como única fuente de carbono y energía mediante la inducción del plásmido responsable de la expresión de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa, la cual se encuentra ligada a membrana y posee la capacidad de oxidar el CO en solución acuosa.

En este trabajo se realizó la obtención y purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa, a partir de extractos celulares de la bacteria *Oligotropha carboxidovorans*, cepa OM 5, esto con el objetivo de emplearlo en el diseño de un biosensor amperométrico para monóxido de carbono.

Material y métodos

- *Organismos*: Se utilizó la bacteria *Oligotropha carboxidovorans*, cepa OM 5, obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC No. 49405).
- *Medio de crecimiento*: Para el crecimiento autotrófico de *O. carboxidovorans* se utilizó el medio mineral ATCC No. 1789, que contenía la siguiente composición (g/l de agua destilada): Na₂HPO₄, 12 H₂O (9,0 g), KH₂PO₄ (1,5 g), NH₄Cl (1,5 g), MgSO₄·7 H₂O (0,2 g), CaCl₂·2 H₂O (20 mg), citrato férrico de amonio (1,2 mg), elementos trazas (1 ml). El pH final fue de 6,8.
- *Elementos trazas* (mg/L de agua destilada): ZnSO₄·7 H₂O (100 mg), MnCl₂·4 H₂O (30 mg), H₃BO₃ (300 mg), CoCl₂·6 H₂O

(200 mg), $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 mg), $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (20 mg), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (900 mg), $\text{Na}_2 \text{SeO}_3$ (20 mg).

El crecimiento autotrófico fue realizado mediante la inoculación de *Oligotropha carboxidovorans*, OM 5, en el que la única fuente de carbono disponible para la bacteria provenía del monóxido de carbono. La bacteria fue crecida a partir del liofilizado original en 1 ml del medio de cultivo descrito anteriormente. A partir de esta muestra se realizaron cultivos sucesivos hasta obtener 200 ml de cultivo. El recipiente con el medio de cultivo inoculado fue colocado en un desecador saturado con monóxido de carbono, con agitación constante a 30 °C, durante 96 horas, tiempo necesario para que las células alcanzaran la fase de crecimiento exponencial

Preparación de los extractos enzimáticos

La preparación de los extractos enzimáticos se realizó a partir de 200 ml del cultivo bacteriano crecido; al cual se le agregó lisozima (2 ml por cada 25 ml de suspensión bacteriana), preparada en 0.89 g de NaCl y 100 ml de agua destilada.

Las bacterias con lisozima se colocaron en un baño maría durante 12 horas a 40 °C. Posteriormente, se completó el rompimiento celular por sonicación en un equipo Branson Sonifier (WWR Company), con las siguientes indicaciones:

Output control: 7, Duty Cycle: 60, Time: 10 minutos.

Un volumen final de 5 ml de la suspensión celular tratada con lisozima fue sometida a sonicación con las indicaciones mencionadas anteriormente. La muestra fue colocada en hielo mientras se sometía a sonicación, con el objetivo de evitar su calentamiento. Los períodos de sonicación fueron de dos minutos con un período de descanso de 30 segundos.

Este procedimiento se repitió cinco veces con cada una de las muestras, completando un tiempo total de sonicación de 10 minutos por muestra.

Determinación de la concentración de proteínas de los extractos celulares

La cuantificación de proteínas presentes en el extracto crudo obtenido a partir de la sonicación fue realizado por el método espectrofotométrico de Schleif y Wensink (1981).

Medición de la actividad enzimática de los extractos celulares

La actividad enzimática fue estimada espectrofotométricamente mediante la reducción del azul de metileno en presencia de monóxido de carbono, a 30 °C y 664 nm utilizando un equipo Shimadzu UV 160 A.

El ensayo de actividad enzimática fue realizado de la siguiente manera: La mezcla de la reacción contenía 0.91 ml de buffer KH_2PO_4 (50 mM, pH 7), 0.05 ml de glucosa en buffer 2 mM, 0.02 ml azul de metileno (0.25 mM), 0.01 ml de la mezcla de (1 U de glucosa oxidasa + 1 U de catalasa en buffer). La reacción fue iniciada con 200 mL del extracto enzimático, con un contenido aproximado de 0.1 a 1.8 mg de proteína por ml.

Las mezclas de reacción, mantenidas en las cubetas de 1 cm de diámetro, fueron cerra-

das para evitar el escape del gas y el contacto de los reactantes con el oxígeno del aire y posteriormente, burbujeadas durante 10 minutos con monóxido de carbono. Los ensayos se realizaron en un tiempo total de 1.800 segundos, suficiente para que la reacción se efectuara completamente.

Purificación de los extractos enzimáticos crudos

El extracto crudo fue sometido a los siguientes pasos de purificación:

Solubilización con el detergente Tritón X-100

Esta solubilización fue necesaria debido a que la enzima estaba ligada a membrana y después de la sonicación y centrifugación la enzima se precipitaba con los restos de celulares.

La metodología utilizada consistió en agregar a cada 600 mL de extracto celular después de la sonicación, 200 mL de Tritón X-100; se homogenizó la solución. El detergente se dejó actuar por una hora. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 10.000 rpm durante 45 minutos en una centrífuga refrigerada. Se tomó el sobrenadante y el detergente remanente fue retirado mediante diálisis.

Se midió la actividad enzimática en muestras que fueron solubilizadas con Tritón X-100 y muestras que no fueron solubilizadas con el detergente, con el objetivo de determinar qué tan importante es este paso para el proceso de purificación de los extractos.

Columna de Sephadex G-100

La muestra solubilizada se pasó por una columna de exclusión molecular (filtración por gel) preparada según el protocolo de Cooper & Scopes (1982).

El gel utilizado fue el Sephadex G-100, capaz de separar proteínas que posean tamaños entre 4.000 y 150.000. Un gramo de Sephadex G-100, fue solubilizado en 10 ml de alcohol etílico al 10% y, posteriormente, colocado en una pipeta, obteniendo una columna de 1.3x 10 cm de alto.

La columna de Sephadex fue lavada cuatro veces con buffer fosfato de sodio, 0.2 M, pH 7.0. Luego de lavada la columna se tapó y se dejó con el buffer durante tres días antes de usarla.

Se tomaron 300 mL de las muestras, las cuales se eluyeron separadamente en 18 ml del buffer fosfato de sodio, 0.2 M., pH 7, se colocaron en sendas columnas armadas a 4 °C y a una presión atmosférica constante; se recolectaron las fracciones en tubos de 1.5 ml a las cuales se les realizaron las pruebas de actividad enzimática y concentración proteica. Sólo las fracciones que poseían actividad enzimática y mayor concentración de proteína fueron sometidas al siguiente paso de purificación con Ecteolla.

Columna de Ecteolla celulosa

Se preparó un gradiente de diferentes concentraciones de *Ecteolla* (30-80 % w/vol), una capa sobre la otra. La columna fue equilibrada con buffer fosfato 50 mM, pH 7. La elución fue realizada con un gradiente lineal de KCl (0 a 1 M). Un ml del extracto obtenido del paso anterior con Sephadex fue colocado en la capa superior de la columna y se fueron recolectando los resultados en fracciones de 1.5 ml. A todas las fracciones recolectadas se les realizaron las pruebas de actividad enzimática y concentración de proteínas.

Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

En este trabajo se utilizó la electroforesis en poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes, donde no se usan SDS ni 2-mercapto-etanol. Además, el voltaje usado en la corrida electroforética es menor comparado al usado en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

El protocolo usado para la corrida electroforética fue descrito por Ausubel *et. al.* (1989), con modificaciones propias del laboratorio.

Electroquímica

Para las mediciones electroquímicas se utilizó un Potencistato/Galvanostato EG&G 273 con software incorporado EG&G modelo 352/252 SoftCorr™II y una celda cilíndrica de 5 ml de volumen, con desprendimientos laterales para la inyección de los gases con una tapa de teflón diseñada para montar los tres electrodos que conforman el sistema de trabajo.

Como electrodo de trabajo fue utilizado un microelectrodo de platino de 100 μm , como electrodo de referencia fue usado un electrodo de plata/cloruro de plata y una barra de acero sirvió como electrodo auxiliar. El microelectrodo de platino fue pulido con una pasta alúmina-agua (tamaño de partícula 0.3 μm) para remover las impurezas de la superficie electródica antes de realizar los experimentos. La voltametría cíclica fue la técnica empleada en las mediciones.

La caracterización de la electroquímica reversible del aceptor electrónico azul de metileno, 0.25 - 5 mM, (preparado en buffer KH_2PO_4 - NaOH 50 mM) en pH ácido, básico y neutro fue establecida mediante voltamogramas to-

mados a diferentes velocidades de barrido (5 - 500 mVs^{-1}) y entre el rango de -0.130 y -0.250 V. Para cada una de las mediciones electroquímicas la celda fue burbujeada con nitrógeno (N_2) por 15 minutos para ser deoxigenada. Los experimentos para el sistema completo (azul de metileno + extracto enzimático de CODH + CO) fueron realizados en buffer a pH 7.00, condición apropiada para la CODH, y en medio aeróbico, anaeróbico y diferentes concentraciones de sustrato (CO). En solución acuosa se usaron diferentes concentraciones del mediador electrónico, al igual que cantidades variables de este, del extracto enzimático y del sustrato, con el fin de determinar el efecto del sustrato y/o el extracto enzimático en la electroquímica del mediador.

Resultados

Extracción y purificación enzimática

Extractos enzimáticos

El rompimiento celular de las muestras sometidas a sonicación fue verificado mediante microscopía óptica, observándose diferencias significativas en las muestras tratadas, indicando que la eficiencia en el rompimiento de las células no era el mismo en todos los casos.

Cuantificación de la concentración de proteínas de los extractos enzimáticos

La concentración de proteínas de los extractos varió dependiendo de la cantidad de células lisadas; aunque el procedimiento era el mismo en cada sonicación, el número de bacterias rotas determinado por un conteo de cé-

lulas antes y después de la sonicación variable, lográndose concentraciones proteicas desde 1.21 mg/ml hasta 23.4 mg/ml.

Actividad enzimática

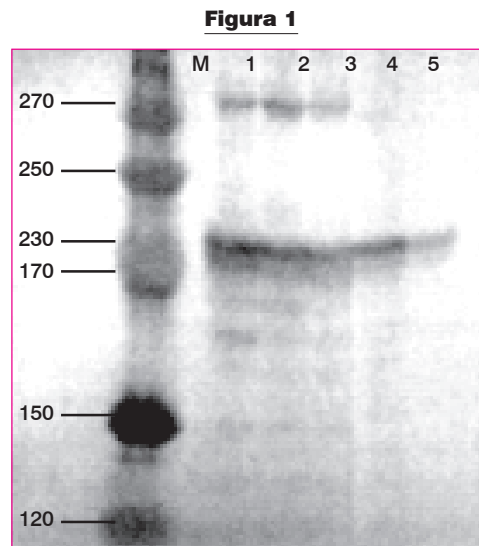
Se midieron las actividades enzimáticas iniciales de cuatro muestras (M1, M2, M3 y M4) con las que se continuó el proceso de purificación, teniendo en cuenta que estos extractos fueran los de mayor concentración de proteína y que mostraban buena actividad catalítica. En adelante solo se hará referencia a la muestra (M2) que presentó mayor actividad enzimática específica (36 microU/mg) y una concentración de 5,148 mg/ml.

Purificación del extracto enzimático crudo

La muestra anteriormente mencionada se pasó por una columna de Sephadex g-100, empleándose para ello 120 ml del buffer de elución, los cuales fueron recolectados en 12 fracciones de 1 ml cada una, después de la fracción número 12 no se observaba actividad enzimática, ni proteína.

Se agruparon las fracciones que contenían actividad enzimática y concentración de proteínas en una sola fracción y se tomaron 300 ml colocándola en el extremo superior de senda columna de *Ecteolla celulosa*. Al final de la cromatografía se obtuvieron seis fracciones de 1 ml. La depuración de proteínas a través de los pasos de purificación se puede observar en la Figura 1.

Se puede observar como va disminuyendo el número de bandas a medida que aumentan los pasos de purificación. En el pozo uno se observan cinco bandas definidas correspondientes a las diversas proteínas presentes en



Gel de electroforesis en condiciones no desnaturalizantes con muestras en los diferentes pasos de purificación (M: Marcador de peso molecular, 1: Muestra extracto crudo, 2 y 3: muestra después de pasar por Sephadex, 4 y 5: muestra después de pasar por *Ecteolla*).

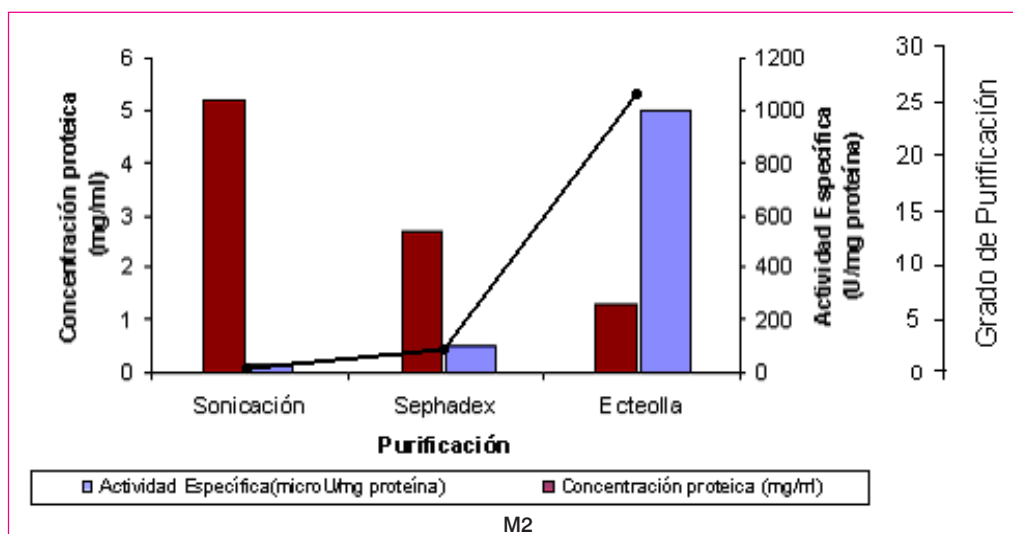
el extracto crudo, mientras que en los pozos cuatro y cinco se observa una sola banda correspondiente a la enzima purificada.

Los resultados muestran que utilizando sucesivamente las columnas de Sephadex G-100 y *Ecteolla celulosa*, se lograron grados de purificación que oscilaron entre 2 a 100 veces con Sephadex y 6,7 a 200 veces con *Ecteolla celulosa*, para el caso específico de M2, se lograron grados de purificación tres veces con Sephadex y 25 veces con *Ecteolla celulosa* (Figura 2).

De otro lado, se determinó si el proceso de solubilización proteica por medio del Tritón X-100 estaba influyendo sobre la purificación de la proteína, de ahí que para M2 se obtuvo una actividad enzimática específica de 30 microU/mg antes de Tritón X-100 y 110 microU/mg después del Tritón X-100.

Es importante indicar que si cambiaba la secuencia de purificación, pasando el extracto

Figura 2



Comparación entre la concentración de proteínas y la actividad enzimática específica de la muestra M2 a través de los pasos de purificación.

enzimático primero por la columna de *Ecteolla celulosa* y luego por la de Sephadex G-100, la actividad enzimática del extracto se perdía.

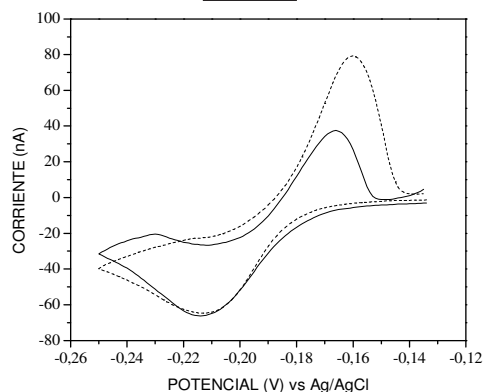
Estudios electroquímicos

Voltametría cíclica

Los experimentos de voltametría cíclica no mostraron indicios de electroactividad directa del monóxido de carbono deshidrogenasa. El CO tiene un efecto en la disminución de la

corriente anódica sobre la voltametría del azul de metileno, mientras la corriente catódica permanece estable. La Figura 3 muestra la diferencia entre el voltamograma para el azul de metileno ($\frac{3}{4}$) y con la adición del sustrato CO al sistema en la presencia del mediador y CODH, dando como resultado un aumento en la corriente anódica (—).

Figura 3



Voltamograma cíclico de azul de metileno (2.5 mM) en buffer fosfato 50 mM, pH 7, saturado con nitrógeno, saturado con CO: ($\frac{3}{4}$) solo; (—) con la adición de 0.36 ml de extracto enzimático.

Discusión de resultados

Extracción y purificación enzimática

El grado de ruptura celular fue aproximadamente del 85%, determinado por medio de conteos celulares antes y después de la sonicación. El método de ruptura recomendado es la prensa francesa, usado por Meyer & Schlegel (1979), el cual tiene la ventaja de hacer estallar las células de forma uniforme, logrando mayor efectividad en la ruptura.

El decrecimiento de la absorbencia del azul de metileno es una medida indirecta de la oxidación del monóxido de carbono. La absorbencia disminuye a medida que transcurre el tiempo de reacción y el color de la mezcla de reacción cambia desde un color azul (estado oxidado del azul de metileno) hasta incoloro (estado reducido del azul de metileno). La actividad de oxidación del monóxido de carbono del extracto crudo fue baja en comparación a las reportadas por Meyer & Schlegel (1979); sin embargo, se logró un aumento importante en la actividad enzimática específica de los extractos después de los procedimientos de purificación proteica.

Los resultados mostraron que la actividad específica de la proteína aumentó con los pasos de purificación, al mismo tiempo que se notó una reducción en la concentración de proteínas. La mayor tasa de purificación lograda fue de 200 veces. Estos resultados tienen diferencias con los trabajos reportados por Meyer y Schlegel (1980), donde se realizaron más pasos de purificación: ultracentrifugación del sobrenadante inmediatamente después de rotas las células, seguido por una cromatografía en gradiente de densidad de sacarosa, diálisis para eliminar los restos de sacarosa, concentración con Sephadex G-25, cromatografía de *Ecteolla celulosa*, diálisis y, finalmente, gradiente de densidad de sacarosa. Todos estos pasos les permitieron a estos investigadores obtener una purificación de 35.5 veces con una actividad enzimática específica de 1.9 mg/unidades. En nuestro trabajo, el extracto enzimático obtenido de la ultracentrifugación no tenía actividad enzimática, por lo que este paso fue reemplazado por

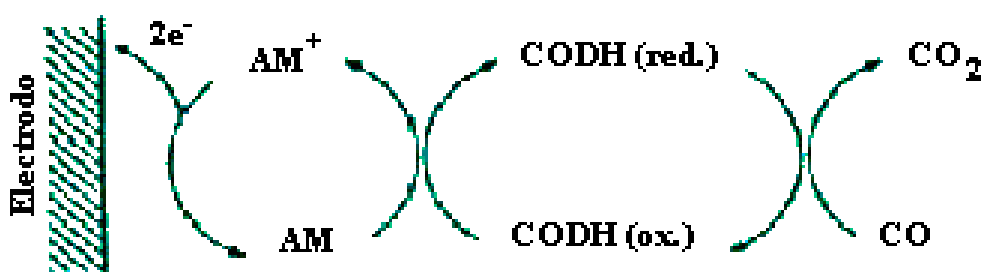
centrifugación a 5.000 rpm, con el único objetivo de precipitar los restos celulares. Además, fue necesario el tratamiento de las muestras con Tritón X-100 para separar la enzima de los restos celulares. Meyer y Schlegel partieron de un cultivo de 10 litros en un fermentador, mientras que en nuestro trabajo se parte de un cultivo de sólo 200 ml, debido a la imposibilidad de utilizar tales cantidades de medio de cultivo.

La actividad inicial de la enzima medida en los extractos crudos, tuvo una amplia variación, esto puede deberse al método de sonicación empleado para el rompimiento celular. Aunque el número de células sometidas al procedimiento fue aproximadamente el mismo en cada caso y el protocolo usado fue el mismo, se observó que al final de la sonicación el número de células rotas varió ampliamente. A partir de gel de poliacrilamida se puede comprobar que los pozos 4 y 5 (muestra después de pasar por *Ecteolla*) sólo presentan una banda visible, la cual tiene un peso molecular aproximado a 230.000, correspondiente al de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa.

En el pozo 1 se presentan varias bandas, de las cuales se observan dos grandes y visibles, una a 270.000 y otra a 230.000. Este gel muestra cómo disminuye el número de bandas a medida que aumentan los pasos de purificación, logrando una buena purificación enzimática.

Aunque a partir del gel de poliacrilamida se puede decir que los pasos de purificación fueron eficientes para lograr la remoción de proteínas diferentes a la enzima de interés, se re-

Figura 4



Oxidación electroquímica de monóxido de carbono con el uso de azul de metileno (AM^+) como un mediador electrónico, $CODH (red.)$ y $CODH (ox.)$.

comienda utilizar una columna de Sephadex G-120, de esta forma sería más eficiente el proceso de purificación, debido a que el tamaño de las partículas que conforman este gel es mayor, aumentando el rango de separación.

Las pruebas electroquímicas se fundamentan en la oxidación de CO por la enzima $CODH$, el sustrato reducido, CO , dona un par de electrones a la enzima; estos seguidamente son aceptados por el sustrato oxidado azul de metileno (AM_{ox}), el cual es, por lo tanto, reducido, como lo indica la siguiente ecuación:



Y, finalmente, reoxidado sobre la superficie del electrodo de platino. La Figura 4 muestra el esquema de la reacción:

El acoplamiento de la enzima $CODH$ con el azul de metileno y la superficie electródica permite explorar en el diseño de un biosensor para CO , en el cual el mediador participa fácilmente en la reacción redox con el componente biológico ayudando en la rápida transferencia electrónica y haciendo el sistema menos susceptible a sustancias interferentes debido a los potenciales más bajos de electrodo.

La Figura 3 muestra la prueba realizada con el sistema completo, variando la cantidad de extracto enzimático adicionado a la celda electroquímica. La adición del sustrato al medio de reacción en presencia del extracto enzimático y el mediador mostró un aumento en la corriente anódica, que comprueba el intercambio de electrones entre el CO y el azul de metileno, mediado por el extracto enzimático. La diferencia en el aumento de la corriente anódica entre las dos pruebas es mínima (≈ 15 nA) lo que muestra que independiente de la cantidad de extracto adicionado, se necesita tener suficiente cantidad de enzima activa presente en el mismo para que se lleve a cabo, de manera efectiva, la catálisis enzimática que permita un notable aumento en la corriente anódica del mediador electrónico una vez este es reoxidado en la superficie electródica.

Conclusiones

- Se logró la purificación de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa a partir de extractos celulares procedentes de la bacteria *Oligotropha carboxidovorans*, cepa OM 5.

- La actividad enzimática aumentó a medida que aumentaron los pasos de purificación, esta actividad fue directamente proporcional a la cantidad de proteína obtenida después de la sonicación. Para lograr una buena purificación proteica se debe optimizar el proceso de rompimiento celular, utilizando, por ejemplo, una prensa francesa.
- La actividad enzimática específica medida a partir del cambio en la absorbancia del azul de metileno, aumentó cuando los extractos celulares fueron sometidos a tratamiento con el detergente Tritón X-100, corroborando la hipótesis de que la enzima estaba ligada a membrana.
- El cambio en el orden de la secuencia de purificación dio como resultado la pérdida de la actividad enzimática de las muestras obtenidas. Se podría aumentar la actividad enzimática específica implementando una mayor cantidad de pasos de purificación.
- Mediante un marcador de peso molecular, se determinó que la proteína purificada tenía un peso molecular de 230.000, lo cual, según la literatura, corresponde al peso de la mayoría de las enzimas monóxido de carbono deshidrogenasas presentes en bacterias carboxidótrofas.
- Extractos celulares de *Oligotropha carboxidovorans*, los cuales contienen la monóxido de carbono deshidrogenasa, han me-

diado en el intercambio de electrones entre el monóxido de carbono y el azul de metileno en solución acuosa, lo que permite la detección del sustrato.

Bibliografía

- AUSUBEL, F. M., et. al. *Short Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley. (1989).
- CALVO, J.E; DANILOWICZ, C. *Amperometric Enzyme Electrodes*. J. Braz. Chem. Soc. 1987. 8(6): 563-574.
- COOPER, T.; SCOPES, M. *The Tools of Biochemistry*. New York: Wiley. 1982.
- COPELAND, R. A. *Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocols*. New York: Chapman & Hall. 1993.
- CUNNINGHAM, A. J. *Introduction to Bioanalytical Sensors*. New York: Wiley and Sons. 1998.
- DEVLIN, T. M. 1993. *Bioquímica. Libro texto con aplicaciones clínicas*. Barcelona, España: Editorial Reverté.
- DOBBEK, H.; et. al. *Biochemistry*. 1999, 96, 8884-9.
- GNIDA, M.; et. al. *Biochemistry*. 2003, 42, 222-30
- MEYER, O., SCHLEGEL, H. G. *Oxidation of carbon monoxide in cell extracts of Pseudomonas carboxidovorans*. J. Bacteriol. 1979. 137: 811-817.
- _____. *Carbon-monoxide: Methylene blue oxidoreductase from Pseudomonas carboxidovorans*. J. Bacteriol. 1980. 141: 74-80.
- _____. *Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1983. 37: 277-310.
- _____. *Ann. Rev. Microbiol.* 1983, 37, 277-310.
- RAGSDALE, S.; Kumar, M. *Chem. Rev.* 1996, 96, 2515-39.
- SCHLEIF, R. F and Wensick, P. C. *Practical Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Verlag. (1981).
- Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No. 48. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994, 44, 183-2.
- TURNER, A.P.F., Aston, W.J., Higgins, I.J., Bell, J.M., Colby, J., Davis, G., Hill, H.A.O. *Anal. Chim. Acta* 1984, 163, 161-74