

## Caracterización preliminar de la PP-Glk de *Streptomyces peucetius* var. *caesius*

Berenice Hernández, Beatriz Ruiz-Villafán, Romina Rodríguez-Sanoja, Sergio Sánchez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, CdMx, 04510,  
beatrizruiz@biomedicas.unam.mx

*Palabras clave:* glucosa cinasa, polifosfato, *Streptomyces*

**Introducción.** *Streptomyces peucetius* var. *caesius* es una bacteria de importancia industrial, ya que produce adriamicina o doxorubicina (DXR), de amplio uso para el tratamiento del cáncer (1). La producción de DXR en la bacteria se ve afectada negativamente por el mecanismo de represión catabólica por carbono (RCC). Aunque no se ha establecido el mecanismo por el cual se lleva a cabo la RCC, se ha probado en *Streptomyces coelicolor* que la enzima glucosa cinasa dependiente de ATP (ATP-Glk) tiene un papel relevante dentro del mismo (2). Al igual que en *S. coelicolor*, Segura *et al.*, (3) aislaron mutantes de *S. peucetius* var. *caesius* que resultaron con defectos en la enzima ATP-Glk y con ello se volvieron insensibles a RCC.

En *S. peucetius* var. *caesius* se ha detectado la presencia de una Glk dependiente de polifosfato (PP-Glk) que presenta una alta actividad en comparación con otras PP-Glks de *Streptomyces*, tales como *S. coelicolor*, *S. lividans*, *S. thermocarboxydus* K155, e incluso respecto a su cepa parental *S. peucetius* (4).

Debido a la importancia de las Glks en *Streptomyces* y ya que existen pocos estudios de las PP-Glks en este género, se decidió determinar las características bioquímicas de la PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, para así compararlas con las de su ATP-Glk.

**Metodología.** Para la obtención de la enzima nativa, se realizaron fermentaciones en medio YMG (extracto de levadura 0.5%, extracto de malta 1% y glucosa 100 mM), usando matraces bafleados con 50 mL, durante 48 h con agitación orbital a 180 rpm. Terminada la fermentación se separó el micelio del medio por centrifugación, para después romper las células por sonicación. El extracto crudo fue purificado parcialmente por precipitación diferencial con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . Para determinar las características bioquímicas de la enzima, se usó la fracción 80-100%. La actividad enzimática de la PP-Glk se determinó según Ruiz *et al.*, 2015.

**Resultados.** Con el fin de caracterizar la enzima PP-Glk de *S. peucetius* var. *caesius*, se purificó parcialmente por precipitación diferencial con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . La enzima resultó poco estable bajo condiciones de purificación con columnas de cromatografía (intercambio iónico, filtración en gel, etc.), de ahí que solamente se utilizó la fracción semi-purificada de 80-100% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ . La temperatura óptima de la enzima se determinó incubando la mezcla de reacción a la temperatura deseada y controlando la misma, con un equipo Peltier. De este modo, la temperatura óptima fue de 50°C. Para la determinación de pH óptimo se utilizaron los amortiguadores ácido cítrico-citrato de sodio pH 6, Tris-ácido maleico-NaOH pH 7, Tris-HCl pH 8 y 8.9 y carbonato de sodio-bicarbonato de sodio pH 9.2, 9.5 y 10.1. El pH óptimo que se obtuvo fue de 8.9. Finalmente, se determinaron las constantes cinéticas de la enzima usando diferentes concentraciones de cada uno de los sustratos. Para el caso del polifosfato, se utilizó hexametáfosfato o  $(\text{NaPO}_3)_6$  del que se conoce su peso molecular. En la tabla 1 se resumen los resultados de la caracterización de la enzima PP-Glk de *S.*

*peucetius* var. *caesius*, con relación a las características de la ATP-Glks de la misma cepa. El valor de Km para glucosa de la PP-Glk fue 2.8 veces mayor que el de ATP-Glk, mientras que la Vmax fue 1.9 veces mayor. Por otro lado, la temperatura y pH óptimos de la PP-Glk fueron mayores que los de la ATP-Glk. En *S. peucetius* var. *caesius* se observó mayor actividad de PP-Glk debido probablemente a que esta cepa es sobreproductora de DXR y requiere de un mayor flujo de carbono, de ahí que su actividad sea baja en la cepa parental. Considerando que la ATP-Glk se encuentra unida al transportador de glucosa, podría ser que la PP-Glk también se uniera con el mismo transportador. De ser el caso, al inicio de la fermentación, cuando el pH del medio es 7, actuaría predominantemente la ATP-Glk, acidificando el medio. Finalmente, cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria, el pH se alcaliniza, lo que explicaría el pico de actividad de la PP-Glk a esos tiempos de crecimiento.

**Tabla 1.** Características bioquímicas de las Glks de *S. peucetius* var. *caesius*.

Enzima	PP-Glk		ATP-Glk	
	Glucosa	$(\text{NaPO}_3)_6$	Glucosa	ATP
Km [mM]	4.5 ± 0.39	0.11 ± 0.012	1.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1
Vmax [nmol/min mg]	577.34 ± 18.86	166.03 ± 8.54	1086.7 ± 114.3	1.6 ± 0.2
pH óptimo	8.9		7.5	
T óptima [°C]	50		42	

**Conclusiones.** La presencia de dos Glks activas en esta bacteria podría explicar porque *S. peucetius* var. *caesius* puede degradar una mayor concentración de glucosa en comparación con otras cepas del mismo género.

**Agradecimientos.** Esta tesis fue realizada con el apoyo del proyecto de PAPIIT IN205519. Agradecemos al Dr. Daniel Alejandro Guillén Santos por su asesoría y apoyo para la realización de los ensayos de purificación con el equipo FPLC.

### Bibliografía.

- Otten S, Stutzman-Engwall K & Hutchinson C (1990) *J. Bacteriol.* 172 (6): 3427-3434.
- Angell S, Schwartz E & Bibb JM (1992). The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol. Microbiol.* 6: 2833-2844
- Segura D, González R, Rodríguez R, Sandoval T, Escalante L & Sánchez, S (1996) *ASPA J. Mol. Biol. Biotechnol.* 4: 30-36.
- Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Aguilar-Osorio G, Gosset G & Sánchez S (2015) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(13):6061-71.

