

ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS PIRUVATO CINASA EN LA CIANOBACTERIA *Synechocystis* sp. PCC6803

Yéssica Matas y Elizabeth Ponce

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Departamento de Acuicultura, Biotecnología Marina. Km. 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, B. C. México. C.P. 22860.

Fax: (646)175-05-34 E-mail: eponce@cicese.mx

Palabras clave: *Determinación bioquímica, piruvato cinasa, pigmentos.*

Introducción. Los cambios celulares en respuesta a los efectos externos (luz o carbono) juegan un papel crucial para el crecimiento y la composición bioquímica (1). Dependiendo del flujo metabólico que es regulado principalmente por la enzima piruvato cinasa (Pyk) que forma ATP y piruvato. A partir de este surge la síntesis de los componentes celulares algunos de interés biotecnológico como pigmentos. La mayoría de los microorganismos contienen una Pyk a diferencia de las enterobacterias que contienen dos, una activada por AMP (PykA) y otra por fructosa,1-6,bifosfato (F16bF) (PykF). En *Synechocystis* se identificaron 2 genes de *pyk* por homología con otras (2) a diferencia de *Synechococcus* 6301 que contiene solo una Pyk (3). El objetivo del presente trabajo fue determinar la composición bioquímica, la actividad de Pyk con AMP y F16bF en diferentes fases de crecimiento y su relación con la síntesis de pigmentos.

Metodología. Se realizaron cultivos en luz, oscuridad con y sin glucosa (Glc) 5 mM, fotoperíodo y agitación. Se tomaron muestras en diferentes fases de crecimiento y se determinó la composición bioquímica (proteínas, carbohidratos, lípidos), pigmentos (4) y crecimiento a una A_{730} (DO) y conteo celular. La actividad de Pyk fue como en *E. coli*.

Resultados y Discusión. El crecimiento en los cultivos luz/Glc fue 1.56 veces mayor al inicio que los de luz llegando ambos a una DO de 8.46. Los de oscuridad se mantuvieron igual (0.012) y oscuridad/Glc llegaron a 0.2816 hasta el 6to día disminuyendo después 2.5 veces. Por otro lado, las proteínas fueron mayor en la fase exponencial en cultivos luz/glc y sin glc (1.1479 y 0.981 $\mu\text{g}/1$ millón células) y disminuyó 3 veces en la fase estacionaria, el de oscuridad/glc (0.2157 $\mu\text{g}/1$ millón) fue 2.8 veces mayor que sin glc. Los carbohidratos en cultivos luz/glc y sin glc tuvieron concentraciones semejantes como máximo 0.2643 $\mu\text{g}/1$ millón células en la fase exponencial y en oscuridad fue 2.11 veces menor pero 4.46 veces mayor a los que no tenían glc. Los lípidos tuvieron como máximo 2.24 $\mu\text{g}/1$ millón células en oscuridad/glc al final de la fase exponencial en cambio los que estuvieron en luz fue 20 veces menor. Se ha visto que el estrés por temperatura y altas concentraciones de sal aumenta la síntesis de lípidos y según los resultados obtenidos el estrés por falta de luz también provoca un aumento de lípidos.

Los resultados obtenidos de actividad de Pyk observamos mayor actividad con AMP en los cultivos sin glc y mayor actividad con F16bF en cultivos con glc (Fig. 1a, b).

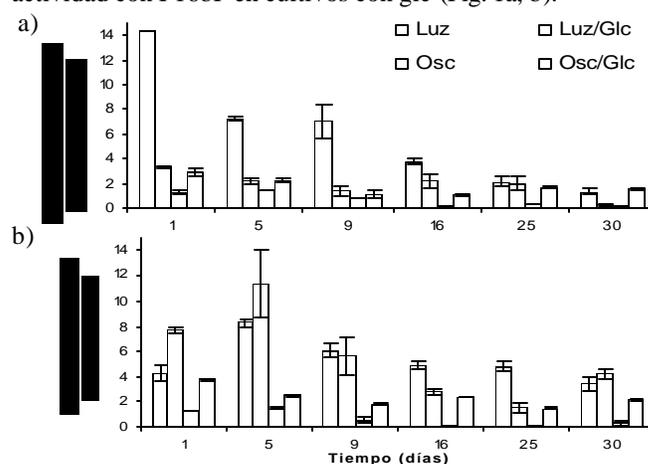


Fig. 1. Actividad específica de Pyk a) con AMP y b) con F16bF.

La mayor concentración de pigmentos fue en los cultivos con glc, observándose mayor concentración de clorofila *a* (19.153 $\mu\text{g}/\text{mL}$), xantofilas (4.007 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y β -caroteno (3.853 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Conclusiones. La composición bioquímica fue menos afectada por la adición de glc que por la ausencia de luz, siendo más notorio para lípidos. En las determinaciones de Pyk se observó actividad con AMP que fue mayor en condiciones de fotosíntesis y F16bF que fue mayor en cultivos con glc, existiendo una coordinación entre las dos isoenzimas dependiendo de los requerimientos de la célula y la condición de crecimiento sin existir una relación directa con la producción de pigmentos.

Agradecimientos. Apoyo financiero por CONACyT.

Bibliografía.

- Gill R., Katsoulakis E., Schmitt W., Taroncher G., Stephanopoulos G. (2002). Genome-wide dynamic transcriptional profiling of the light-to-dark transition in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Bacteriol.* 184(13):3671-3681.
- www.kazusa.or.jp
- Knowles V., Smith C., Smith C. y Plaxton W. (2001). Structural and regulatory properties of pyruvate kinase from cyanobacterium *Synechococcus* PCC6301. *J Biol Chem.* 276(24): 20966-72.
- Chapman, D. (1998). *Experimental Phycology*. Cambridge University Press.