



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



LA POLIFOSFATO GLUCOSA CINASA DE *Streptomyces peucetius* var. *caesius*.

Beatriz Ruiz-Villafán, Romina Rodríguez-Sanoja y Sergio Sánchez, Depto. Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D.F. C.P. 04510, correo: beatrizruiz@biomedicas.unam.mx.

Glucosa cinasa, Streptomyces, polifosfato.

Introducción. Las enzimas que fosforilan glucosa son hexocinasas o glucosa cinasas (Glc). Éstas últimas son capaces de utilizar diversos donadores del grupo fosfato como ATP, fosfato inorgánico (polifosfato) o ADP. Las Glcs que utilizan polifosfato (pp-Glc) solamente se han encontrado en microorganismos Gram positivos, como *Microlunatus phosphovorans*, *Arthrobacter* sp., así como en la actinobacteria patógena *Mycobacterium tuberculosis* (1). El único informe sobre la presencia de una pp-Glc en *Streptomyces* se reportó para el microorganismo productor de clortetraciclina, *S. aureofaciens* (2). Sin embargo, en *S. coelicolor*, el modelo de este género, sólo se ha reportado la presencia de una ATP-Glc pero ninguna actividad de pp-Glc, a pesar de que en el genoma hay una secuencia de una probable pp-Glc (SCO5059). Debido al papel importante que se ha asignado a la enzima ATP-Glc en el mecanismo de represión por carbono en *Streptomyces* (3), resulta de interés conocer la posible presencia de enzimas pp-Glc en *S. coelicolor* y otras cepas del género *Streptomyces*.

Es así que en este trabajo se planteó como objetivo determinar el número y tipo de Glcs que posee *Streptomyces peucetius* var. *caesius* y *S. coelicolor*.

Metodología. *S. peucetius* var. *caesius* se creció en medio mínimo NDYE (4) con 100 mM de glucosa, manosa o glutamato. *S. coelicolor* fue cultivado en medio NMMP (3) con 50 mM de glucosa. Se separaron las células del medio y a éste se le determinó pH y carbohidratos residuales. Las células se rompieron por sonicación y al extracto obtenido, se le determinó la concentración de proteína (por el método de Bradford) y actividad de glucosa cinasa, según reportan Imriskova *et al.* (2001). Para determinar el número de enzimas con actividad Glc se realizaron zimogramas como describe Imriskova *et al.* (2001).

Resultados y discusión. *S. peucetius* var. *caesius*, mostró crecimiento logarítmico desde las 0 hasta las 12 h de incubación, momento en el que alcanzó la fase estacionaria e inició la producción de metabolitos secundarios, en este caso antraciclinas. Como era de esperarse, la producción de Glc fue mayor en presencia de glucosa que con glutamato o manosa. La actividad aumentó hasta alcanzar un máximo a las 12 h. Para verificar si dicha actividad era dada por una o más enzimas se realizaron zimogramas en geles nativos. En todos los zimogramas de los tres sustratos, se observó

una banda de actividad de 124 kDa, dicha banda fue secuenciada y se encontró que había dos Glcs. La primera era una ATP-Glc, ya reportada (5), y la otra una Glc dependiente de polifosfato (pp-Glc). Con el fin de confirmar la presencia de ambas enzimas, se realizaron ensayos de actividad usando ATP o polifosfato como sustratos de fosforilación. Ambas actividades se encontraron en los extractos crudos de *S. peucetius* var. *caesius*, pero con máximos de producción a diferentes tiempos. Así mismo, se buscó la actividad de pp-Glc en *S. coelicolor*, pero no se encontró, a pesar de que como se mencionó anteriormente, se encuentra presente un gen que codifica para una probable pp-Glc (SCO5059). La presencia de dos actividades de Glc en *S. peucetius* var. *caesius*, podría modificar el modelo de represión aceptado hasta ahora para el género *Streptomyces*, en el cual la ATP-Glc tiene un papel central. Sin embargo, falta demostrar cuál es el papel que juega cada una de estas Glcs en el metabolismo de glucosa, y si alguna de ellas o ambas juegan algún papel en el mecanismo de RCC de este estreptomiceto.

Conclusiones. La presencia de dos Glcs indica que el mecanismo de represión catabólica en *S. peucetius* var. *caesius* podría ser distinto al modelo planteado hasta el momento para los estreptomicetos.

Agradecimiento. Los autores agradecen el apoyo al desarrollo de este trabajo al proyecto DGPA 202 903-3.

Bibliografía.

1. Kawai, S, Mukai, T, Mori, S, Mikami, B and K Murata. (2005) Hypothesis: structures, evolution, and ancestor of glucose kinases in the hexocinase family. *J. Biosci. Bioeng.* 99(4): 320-30.
2. Hostálek, Z, Tobek, I, Bobyk, M A and Kulayev, I S (1976) Role of ATP-glucokinase and polyphosphate glucokinase in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol* 21: 131-8.
3. Angell, S, Lewis, CG, Buttner, M J and Bibb, M (1994) Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2) a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* 244:135-43.
4. Dekleva, ML, Titus, J A and Strohl, W R (1985) Nutrient effects on antracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* 31: 287-294
5. Imriskova, I, Langley, E, Arreguín-Espinosa, R, Aguilar, G, Pardo, JP and Sánchez, S (2001) Rapid purification and biochemical characterization of glucose kinase from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 394 (2): 137-144.