

Bol. Inst. Quím. Univ. Nacl. Autón. Méx. 21, 255-258 (1969).

## IDENTIFICACION DE LA 3-P-GLICERALDEHIDO DEHIDROGENASA EN LATEX DE *HEVEA BRASILIENSIS*

*B. Arreguín y J. Salazar del Río\**

Contribución No. 300 del Instituto de Química.  
Recibido, septiembre 22, 1969.

Utilizando las técnicas enzimáticas usuales, se determinó la presencia de la 3-P-gliceraldehido dehidrogenasa\*\* en la fracción acuosa del látex de *Hevea brasiliensis*. La presencia de esta enzima junto con otras previamente determinadas,<sup>1,2</sup> confirma la existencia del metabolismo de carbohidratos en este látex.

### PARTE EXPERIMENTAL

En la estación agrícola "El Palmar", Veracruz, se colectó el látex directamente en recipientes de plástico enfriados con CO<sub>2</sub> sólido, lográndose así su coagulación inmediata, previa a su traslado a la ciudad de México.

Pocas horas después el látex se descongeló y centrifugó a 29,000 rpm, separándose varias zonas, como ya se describió anteriormente.<sup>1</sup> La fracción acuosa (57%) se separó y se liofilizó. Se obtuvieron así 5.43 g de un polvo blanco amorfo, que se conservó a 5°.

La actividad enzimática se determinó por medio de la reducción de NAD<sup>+</sup> que se midió, en la forma especificada, a 340 mμ en un espectrofotómetro. Esta reducción la efectúa la 3-P-gliceral-

\* Tomado en parte de una tesis que presentó Jorge Salazar del Río a la Facultad de Ciencias de la UNAM, para obtener el título de Biólogo.

\*\* La Letra P indica el radical fosfato.

dehido dehidrogenasa cuando se incubaba en presencia de 3-P-glicer-aldehido y las soluciones reguladoras adecuadas. Se determinó el efecto de la concentración, encontrándose que daba una línea recta, lo cual demuestra que la reacción procede sin interferencias (Fig. 1).

Después se determinó el pH óptimo de actividad empleando diferentes soluciones reguladoras<sup>3</sup> (ácido cítrico-citrato para pH de 3 a 6; fosfato monobásico de sodio-fosfato dibásico de sodio para pH 5.7 a 8 y Tris-HCl para pH de 7.2 a 9.0). Se encontró que el pH óptimo era a 7.5.

La actividad específica se determinó tomando la extinción a 340 m $\mu$  respecto a 1 mg de proteína (determinada con los métodos usuales) en el primer minuto de incubación (Fig. 2). En el suero liofilizado, esta actividad específica fue de  $2.51 \times 10^{-3}$  m $\mu$  moles/min/mg de proteína.

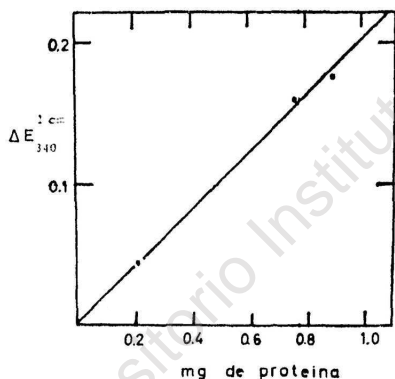


Figura 1

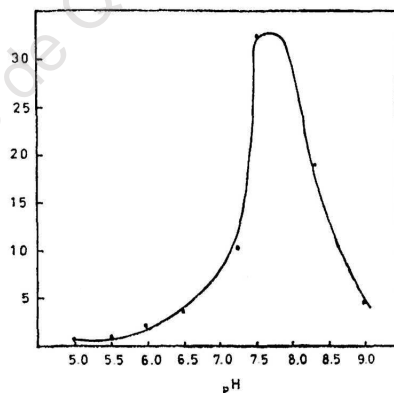


Figura 2

Para concentrar a la enzima 3-P-glicer-aldehido deshidrogenasa, se hicieron precipitaciones sucesivas con sulfato de amonio, procediendo en la forma usual (Tabla I). Se encontró que la mayor actividad se encontraba en el líquido sobrenadante final, en el que la actividad específica fue de  $17.2 \times 10^{-3}$  a pH 8.4.

T A B L A I

Fracción	% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en cada precipitación	Actividad total en $\mu$ moles/min	Proteína total mg	Actividad específica	Recuperación %	Factor de purificación
Suero dializado 1.895 g		$6.88 \times 10^{-1}$	270.0	$2.51 \times 10^{-3}$	100	1.0
Precipitado I	40	$1.05 \times 10^{-1}$	22.4	$4.72 \times 10^{-3}$	15.3	1.8
Precipitado II	60	$79 \times 10^{-1}$	51.1	$1.56 \times 10^{-3}$	11.6	0.6
Precipitado III	65	$70 \times 10^{-1}$	24.0	$2.93 \times 10^{-3}$	10.2	1.1
Precipitado IV	73	$95 \times 10^{-1}$	16.0	$5.97 \times 10^{-3}$	13.9	2.3
Sobrenadante		$2.74 \times 10^{-1}$	16.0	$17.2 \times 10^{-3}$	39.8	6.7

Con esta fracción se determinó el peso molecular por centrifugación en un gradiente de sacarosa,<sup>4</sup> comparándola con albúmina de suero humano de peso molecular 68 000, obteniéndose un PM de 78 500 para esa fracción. (Fig. 3).

Se determinó la constante de Michaelis-Menten variando la concentración de sustrato (3-P-gliceraldehído), manteniendo constante la cantidad de proteína y de  $\text{NAD}^+$  (Fig. 4). Aplicando luego la ecuación de Lineweaver-Burke se obtuvo, para una concentración de  $\text{NAD}^+$  .01 M, un valor de  $4.57 \times 10^{-5}$ .

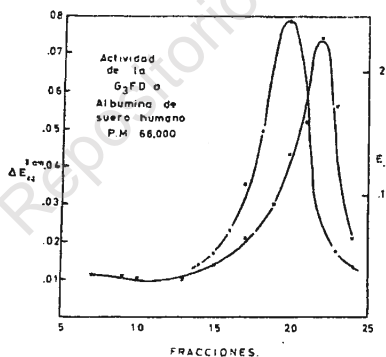


Figura 3

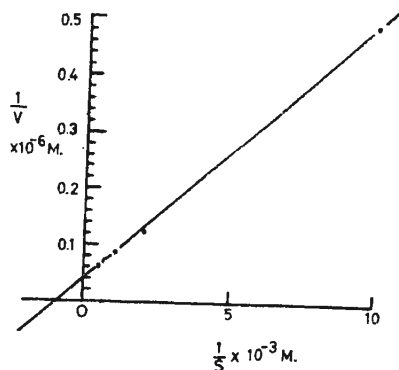


Figura 4

## RESUMEN

Aplicando técnicas usuales para identificar procesos enzimáticos se estableció la presencia en la fracción acuosa del látex de *Hevea brasiliensis* de la enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. Al encontrar esta enzima junto con otras previamente identificadas en ese látex, se confirma el ciclo metabólico de los carbohidratos.

## ABSTRACT

Applying familiar techniques for identifying enzymatic processes, the presence of the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the aqueous component of *Hevea Brasiliensis* latex has been established. The occurrence of this enzyme together with others previously determined<sup>1, 2</sup> to be active in the latex has been taken to confirm the operation of a carbohydrate metabolic cycle.

## BIBLIOGRAFIA

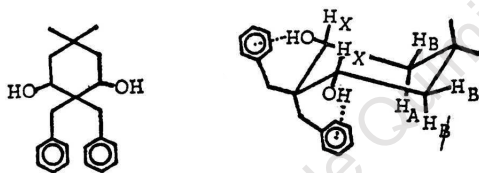
1. B. Arreguín y M. C. Rock, *Este Boletín* **19**, 58 (1967).
2. B. Arreguín, S. W. Toda y A. Bustillos, *R. G. C. P.* **45**, 873 (1968).
3. S. P. Colowick y N. O. Kaplan, *Methods in Enzimology*, Vol. **1**, 138, Academic Press (1955).
4. R. G. Martin y B. N. Ames, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1372 (1961).

## ERRATA, CORRIGENDA, ADENDA,

## Página

- 102 7) Para que el H de la base del OH muestre constante/ de acoplamiento de uno de los anillos aromáticos;<sup>6</sup> cuando se determina el IR en /s  
/i
- 106 hexano/6. El espectro de masas (Fig. 29), muestra  $M^+$  306 (que corresponde a la /-5-ona /M  
108 irradiar en 1.75 ( $H_d$ ), cambia la señal de la base del alcohol a /A

111



7a

- 125 Se sintetizó el 3,3-dimetil-6,6-dibencil-biciclo-[3,3,0]-hexano 13. Su /1
- 128 dimetil-3-[1',1'-dibencilmetilen]-ciclopentano-3-ona 14, cuya rnm (Fig. /4
- 132 1,1-Dimetil-3-[1',1'-dibencilmetilen]-ciclopentano-3-ona 14. La parte /4
- 172 2. M. C. Rock, F. Walls y H. Kwart, *Ibid.* 21, / (1969). /102
- 175  $C_4$  y  $C_6$ . Centrada en 1.96 está la señal múltiple de los hidrógenos de  $C_5$ . /d
- 178 alílicos aparece como /os señales dobles centradas a 2.4 y 2.1 y el resto de /d
- 179 y Kwart,<sup>4</sup> han reportado una /iferencia de 0.58 ppm en la posición de las se- /d
- 181 Figura 12.—La señal doble de doble, centrada en 5.06 se debe al hidrógeno en la base del mesilato, con  $J_{ax} = 10$  y  $J_{bx} = 6$  Hz. Estas constantes de acoplamiento hacen suponer que el grupo mesilo está en posición ecuatorial. La señal en 3.0 se debe a los hidrógenos del mesilo y la múltiple cen-

{  $J_{ax} = J_{bx} = 4$  Hz. Ya que la molécula se mueve libremente podemos suponer que estas constantes son el promedio de las dos conformaciones.

- 213 dos influencias tienden a cancelarse mutuamente, lo cual /a

225 butirolactones (1, 2 y 3) y dos dioles (4 y 5) que no estaban des- /a

227 ~~La primera fracción (55%) (p. e. 54° a 1 mm) se identificó~~  
como una mezcla de dimetil nonatrienos, que ya ha sido descrita  
en la literatura<sup>2</sup> y que no se separó en sus componentes.

La primera fracción (55%) (p. e. 54° a 1 mm) se identificó  
La otra fracción (40%) (p. e. 68° a 1 mm), se identificó como

255 sa del látex de *Hevea brasiliensis*. La presencia de esta enzima junto /e

259 The obje~~t~~ive of this study was the attainment of an inexpensive, /c

262 Water~~y~~ (ca. 150 ml) was now added slowly while stirring was con- /<sup>3, 4</sup>

3. At this point addition of ca. 10 ml D<sub>2</sub>O and continued stirring until cessation of gas evolution will assure complete deuteration of the product.

4. The carbinol carbon of secondary alcohols is nearly quantitatively deuterated using this procedure. However, the molecule also becomes partially deuterated by exchange reaction occurring simultaneously at carbons  $\alpha$  to the (former) carbonyl group. This method of preparing carbinol deuterated alcohols is therefore only applicable where deuteration of positions adjacent to the carbinol group is of no consequence, or are required also to be fully deuterated.