

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE CIENCIAS

ALDOLASA EN EL SUERO DE LATEX
de *Hevea brasiliensis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A

GERTRUDIS AMALIA BUSTILLOS AGUILAR

México D. F.

1965



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
INSTITUTO DE QUIMICA
DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
BAJO LA DIRECCION DEL
DR. BARBARIN ARREGUIN

100494

RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento al señor Ing. Angel Vergara C., Ingeniero Jefe del Campo Experimental del Hule "El Palmar", en el Palmar, Veracruz, por su envío del látex, empleado en este trabajo; a la señorita Química Concepción González por su ayuda técnica, y a la señorita Dra. María Cristina Pérezamador, por sus acertadas modificaciones al texto.

I N D I C E

- 1.- Introducción
- 2.- Generalidades
- 3.- Parte Experimental
- 4.- Resultados
- 5.- Conclusión
- 6.- Bibliografía

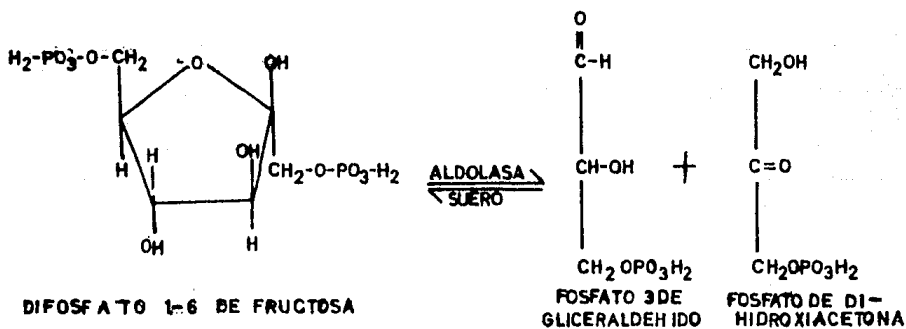
I N T R O D U C C I O N

El hule presenta una estructura politerpénica lineal y en su biosíntesis se ha mostrado la presencia de un paso intermediario irreversible que es la formación de ácido mevalónico por condensación de moléculas de Acetil Co A y la reducción del ácido B-hidroxil B-metil glutárico, como ocurre en todos los compuestos terpenoides. (1)

Conocida la estructura química de este producto natural es interesante determinar la secuencia de reacciones que participan en su biosíntesis. Debido a que ésta presenta cierta complejidad y que en el suero de látex de Hevea brasiliensis se han identificado varias enzimas, como la fosfatasa (2) y deshidrogenasa láctica (3), se pensó en la posible existencia de otras enzimas pertenecientes al Ciclo de la Glucólisis. Teniendo esto presente, se logró identificar la aldolasa, a cuyo estudio se refiere el presente trabajo.

GENERALIDADES

La aldolasa es una enzima soluble (4) que cataliza el rompimiento del difosfato 1-6 de fructosa en dos fosfatos de triosas.



Se encuentra principalmente en los sobrenadantes y con menor frecuencia en el núcleo. Es una enzima predominante en tejidos animales, especialmente en el tejido muscular y en el hígado y en el riñón tiene sólo bajas actividades (4a).

Se ha aislado de varios tejidos animales y en el siguiente cuadro se presentan los datos de actividad enzimática asignando al tejido más activo el valor de 100.

	Hígado	Riñón	Bazo	Corazón	Músculo	Cerebro	Testículo	Sangre
Conejo					100*			
Rata	6*	5	2	6	100*	7	4	0.3

*Se han obtenido en forma cristalizada.

Velick (4b) estudió la síntesis de la aldolasa en el músculo, inyectando a conejos glicina, alanina, lisina, fenilalanina y

metionina marcadas. Después de varias horas aisló del músculo aldolasa y dos enzimas más (una fosforilasa y una deshidrogenasa) y por hidrólisis de las mismas se aislaron los aminoácidos y se midió su actividad específica.

Sin embargo, se ha prestado poca atención a la aldolasa vegetal. Stumpf (5) la aisló del chicharo, purificándola 92 veces e investigadores como Baba (6) y Allen (7) la han estudiado someramente, pero sus propiedades cinéticas y sus funciones biológicas no están bien analizadas, por lo que aún no se ha establecido una comparación con la aldolasa del músculo, tanto por lo que respecta a estas propiedades como a su inhibición y constante de equilibrio.

En tejidos animales se le asigna un peso molecular de 147 000 a 180 000 en el músculo, y de 160 000 en el hígado (8).

La aldolasa es específica para las condensaciones aldólicas, mostrando selectividad para el fosfato de dihidroxiacetona, sin embargo, existen dos grupos de aldolasa que se diferencian por lo que se refiere a su sustrato específico. La enzima de Sacharomyces cereviceae y de Aspergillus niger, por ejemplo, catalizan el rompimiento del enlace aldólico de cetohechosas con velocidades comparativamente bajas.

La aldolasa del músculo y del hígado también presenta diferencias en su actividad, especialmente con el fosfato-1-de fructosa (9).

En la tabla 1 aparecen algunos de los sustratos sobre los que actúa.

<u>Tabla 1</u>		
<u>Sustratos</u>	<u>Producto</u>	<u>Fte. de la Enzima</u>
Difosfato 1-6 de fructosa	Fosfato de dihidrox- acetona + (D-glice- raldehído)	Músculo
Fosfato-1 de fructosa	Fosfato de dihidroxi- acetona + (D-glice- raldehído)	Músculo e hígado
Difosfato-1-6 de sorbosa	Fosfato de dihidroxi- acetona + (L-glice- raldehído 3 fosfato)	Músculo
Fosfato-1-de sorbosa	Fosfato de dihidroxi- acetona + (L-glice- raldehído)	Levadura

La constante de Michaelis (Km) reportada para la aldolasa del músculo varía según el método empleado para su estudio. La reportada para el difosfato 1-6 de fructosa es de 5×10^{-5} M(10) y 6×10^{-5} M(11) y la reportada para el fosfato-1-de fructosa es de 3.4×10^{-3} M(10) y de 5×10^{-2} M(11).

PARTE EXPERIMENTAL

El látex empleado en el presente trabajo, se obtuvo de una plantación (El Palmar, Ver.) de árboles de Hevea brasiliensis, de alto rendimiento, de 15 a 20 años de edad, propagados vegetativamente.

Las condiciones ecológicas de esta plantación son: zona tropical húmeda con suelo fértil, poroso y bien drenado con suficiente profundidad y ligeramente ácido; la temperatura media que prevalece en esta zona de cultivo es de 26 a 28°C con lluvias abundantes (2 000 o más milímetros por año), principalmente después del mediodía, no interfiriendo así, con el "sangrado" de los árboles que se efectúa en las primeras horas de la mañana.

Materiales y Métodos

Obtención del material enzimático.- El látex de Hevea nos fue enviado del campo experimental de El Palmar, Ver. El lote

Abreviaturas empleadas en este trabajo:

di F-1-6-F - Difosfato 1-6 de fructosa

G₃FD - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

NAD - Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina

NADH - Dinucleótido de Nicotinamida-Adenina reducido

NADP - Trinucleótido de Nicotinamida-Adenina

fue de aproximadamente 3 litros que se recolectaron directamente del árbol, en frascos de polietileno, colocados dentro de termos con hielo seco, para evitar la desnaturalización de la proteína. El látex se centrifugó a 29 000 rpm en una centrífuga Spinco modelo L, durante 45 minutos, separándose en cuatro capas:

la superior, de hule semisólida

una capa color naranja muy delgada, adherida a la del hule

una capa líquida (suero), que constituye el 50% de látex y que es precisamente donde se encuentra la enzima estudiada en este trabajo

un residuo amarillento.

El suero fue liofilizado inmediatamente para evitar la pérdida de actividad enzimática y se guardó en un desecador a 5°C.

Identificación de la Enzima

Aplicando al suero el método de Sibley (12), basado en la determinación colorimétrica de las triosas formadas por la acción de la enzima sobre el difosfato 1-6 de fructosa, se puso en evidencia la existencia de la aldolasa. El método consiste en incubar el sustrato a un pH de 8.6 con la muestra por analizar, en presencia de hidrazina para fijar los fosfatos de triosas y desplazar así el equilibrio de la reacción, haciéndola irreversible. Al final del período de incubación, la reacción se interrumpe con ácido tricloroacético; una alícuota del filtrado se trata con álcali para hidrolizar los fosfatos y después, por adición de 2-4 dinitrofenilhidrazina y más álcali, se desarrolla un color característico con un máximo de absorción a 540 mμ. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de la enzima.

El método de Fiske y Subbarow (13) fue también empleado para comprobar la presencia de la aldolasa en el suero del látex.

Purificación de la Enzima

Los métodos usados en los intentos para purificar la enzima fueron:

- a).- Filtración por geles de Sephadex G-100
- b).- Precipitaciones con sulfato de amonio a distintos por cientos de saturación
- c).- El empleado por Stumpf (5) para la purificación de la aldolasa del chicharo

a).- Filtración por Sephadex G-100.- Se utilizaron dos tamaños distintos de columnas de cromatografía según la cantidad de suero que se trataba de purificar. En todos los casos, se pesaron de 8 a 13 g de gel seco, suspendidos en agua destilada, que se hicieron pasar paulatinamente de un embudo a la columna llena de agua que en su extremo inferior tenía lana de vidrio y perlas de cristal. Una vez adicionado todo el gel, para su empleo, la columna se colocó en un cuarto frío a 5°C. Se colectaron fracciones de 3.5 ml (40 gotas) en un colector automático.

b).- Precipitaciones con Sulfato de Amonio.- Para las precipitaciones con sulfato de amonio el suero liofilizado y dializado se saturó al 50%, 60%, 70% y 80% con la solución saturada de sulfato de amonio a pH neutro, en la forma siguiente:

200 mg de suero se disolvieron en 2 ml de agua y se agregó 1 ml de EDTA* (0.2 mg/ml) y se le sometió a una diálisis de doce horas con cuatro cambios de agua bidestilada fría y ajustada a pH 7.0 para evitar la precipitación de proteínas.

*El EDTA (ácido etilen diamino tetraacético) se empleó para evitar el ennegrecimiento del suero que se presentaba cuando se le dejaba en solución por más de 2 horas, debido probablemente a enzimas dependientes del cobre.

Después de la diálisis se recuperaron 3.2 ml de suero, de los cuales se tomaron 0.5 ml para medir la actividad inicial. Los 2.8 ml restantes se precipitaron con sulfato de amonio hasta una saturación de 50%; se filtró por celita y el precipitado se redisolvió en 2.5 ml de agua y se midió su actividad; al sobrenadante se le agregó más solución saturada de sulfato de amonio hasta una saturación de 60% y se repitió la operación anterior dos veces más hasta precipitar a una saturación de 70% y 80%.

e).- Método de Stumpf.-- Para este método, se pesaron 500 mg de suero que se disolvieron en 4.0 ml de agua más 1 ml de EDTA y se dializaron 12 horas en agua bidestilada. Se empezó a precipitar con sulfato de amonio hasta una saturación de 40%, se filtró por celita y el precipitado se redisolvió en 4.0 ml de agua, midiéndose su actividad; el sobrenadante se volvió a precipitar hasta el 51% de saturación y se repitió la operación anterior tres veces más precipitando a 61%, 70% y 80% de saturación. De todos estos precipitados, el más activo fue el de 70%, por lo que se dejó dializando toda la noche para eliminar sulfatos. Se precipitó esta fracción nuevamente hasta el 50% de saturación con acetona fría, pero se perdió la actividad.

Diálisis

Este procedimiento se llevó a cabo usando membrana de celulosa para diálisis, de tamaño variable según el volumen de

suero por dializar, cambiándose el agua bidestilada, enfriada a 2 ó 3°C cada media hora. La diálisis permitió la eliminación de substratos endógenos.

Medida de la Actividad Enzimática

Se determinó por dos procedimientos:

- a).- Métodos químicos (12, 13)
- b).- Método espectrofotométrico (14).

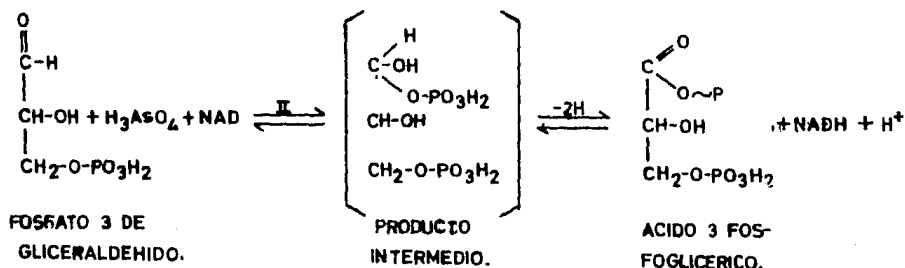
a).- Métodos químicos.-- Se emplearon los mismos métodos que para la identificación de la enzima y el de Sibley ya fue descrito.

El método de Fiske y Subbarow consiste en determinar, después de cierto tiempo, el fósforo inorgánico liberado de los fosfatos de triosas formados.

A la muestra problema se le adicionaron 0.4 ml de ácido sulfúrico 10 N, 0.8 ml de molibdato de amonio al 2.5% y 0.4 ml de agentes reductores. El volumen se llevó a 10 ml con agua destilada y se dejó desarrollar el color a temperatura ambiente durante diez minutos leyéndose la densidad óptica a 660 mμ.

b).- Método Espectrofotométrico.-- Para medir la actividad de la enzima se prefirió por su sencillez el método introducido por Warburg y Christian (14), que está basado en el acopla-

miento de la aldolasa (I) con la gliceraldehído-3-fosfato-des-hidrogenasa (II), en el que el fosfato-3 de gliceraldehído formado por I es oxidado por II en presencia de NAD y arsenato:



La reacción es estequiométrica ya que se reduce una molécula de NAD por cada molécula de difosfato 1-6 de fructosa transformada y la velocidad de la reacción puede obtenerse midiendo, en función del tiempo, la formación de NADH.

La reducción del NAD es un índice de la actividad enzimática, la que se leyó en un espectrofotómetro Beckman, modelo DU, con lámpara de cuarzo, siguiendo la formación de NADH a una longitud de onda de 340 mμ.

Para calcular las moles de difosfato 1-6 de fructosa transformada por minuto se usó la siguiente fórmula:

$$\frac{\log I_0/I \text{ en 1 min.}}{6.22 \times 10^6} = \text{moles de difosfato 1-6 de fructosa/min/ml}$$

donde:

$\log I_0/I$ = Extinción o densidad óptica (D.O.)

6.22×10^3 = Extinción molar del NAD

Se hicieron lecturas a intervalos de 20 segundos durante el primer minuto y de 30 segundos durante los siguientes 10 ó 15 minutos.

Definiciones

Unidad de actividad.- Una unidad de enzima es la cantidad que transforma 1 mg de fósforo en un minuto.

$$\text{Unidades} = \text{Moles de diF-l-6-de F} \times \text{min} \times 2 \times 31 \times 10^3$$

Actividad específica.- Número de unidades por miligramo de proteína.

Determinación de Proteína

La cantidad de proteína de las incubaciones se determinó por los métodos de Biuret (15) y de Folin-Ciocalteu (16).

El color desarrollado en el método de Biuret se mide a 540 mμ y se compara con una curva de calibración hecha con albúmina de suero humano cristalizada. En la mayoría de las determinaciones se pusieron 0.4 ml de la solución problema, 1.6 ml de agua y 4.0 ml del reactivo de Biuret, se agitó y después de 30 minutos se leyó contra un blanco que tenía 4.0 ml del reactivo de Biuret y 2.0 ml de agua.

También se usó el método de Folin-Ciocalteu, que consiste en incubar 2.0 ml de la solución problema con 6.0 ml de car-

bonato de sodio al 12.5% y 1 ml de sulfato de cobre al 0.1%. Después de una hora se adicionó 1.0 ml de reactivo de Folin y se dejó desarrollar el color durante media hora, leyéndose la D.O a 650 mμ, comparándose el color desarrollado con una curva de calibración hecha con albúmina de suero humano cristalizada.

Condiciones de la Incubación para la Medida de la Actividad Enzimática

La mezcla para incubar se preparó con:

0.4 ml de difosfato 1-6 de fructosa (2.4×10^{-3} M de 98% de pureza).

0.3 ml de arsenato de sodio 0.17 M.

0.3 ml de glicina 0.27 M.

0.6 ml de cisteína pH 8.0, 0.1 M.

0.2 ml de NAD 5.0×10^{-3} M.

0.6 ml de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.4 M, pH 8.6.

Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (ver nota).

0.4 ml de solución de suero dializado 3 horas, conteniendo de 3 a 5 mg de proteína.

El Volumen de la incubación se ajustó en todos los casos a 3.0 ml con agua bidestilada. El blanco o control contenía todas

Nota.- Al iniciarse el trabajo la G₃FD empleada era de músculo de conejo pero al comprobar que estaba presente en el suero se suprimió su adición a las incubaciones.

las sustancias con excepción del difosfato 1-6 de fructosa y en su lugar se agregó agua bidestilada. Tanto la mezcla de reacción como el control se dejaron a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos y la reacción se inició con la adición de la enzima. Las lecturas en el espectrofotómetro se hicieron a 21°C.

Determinación del pH óptimo

Para determinar el pH óptimo de la enzima se usaron las siguientes soluciones amortiguadoras:

a).- De citratos 0.4 M para un rango de pH de 3.15 a 5.4.

Solución A: Acido cítrico (21.01 g/1000 ml)

Solución B: Citrato de sodio (117.6 g/1000 ml)

b).- De Tris-HCl 0.4 M en un rango de pH de 6.93 a 9.2.

Solución A: Tris (Trihidroximetilaminometano)
(48.4 g/1000 ml)

Solución B: HCl (33.6 ml/1000 ml)

c).- De glicina-NaOH 0.4 M en un rango de pH de 9.2 a 11.2.

Solución A: Glicina (30.03 g/1000 ml)

Solución B: NaOH (1.6 g/1000 ml)

Mezclando volúmenes de las soluciones A y B, como se indica en (17), se obtuvieron las soluciones amortiguadoras que se emplearon en las incubaciones. En éstas, la cisteína se ajustó a un pH cercano al de la solución amortiguadora. Al

final de la reacción se midió el pH de la incubación.

Para medir el pH se empleó un potenciómetro Zeromatic-Beckman.

Determinación de la Constante de Michaelis-Menten

Se determinó la constante de Michaelis variándose la concentración de sustrato.

La solución madre de difosfato 1-6 de fructosa (98% de pureza) se preparó con 30 mg en 5 ml de agua, quedando así 6 mg por ml. Para su empleo se diluyó 1:10.

De esta dilución se usaron en las incubaciones 0.6 ml, 0.3 ml, 0.25 ml, 0.15 ml y 0.1 ml que contenían respectivamente, 3.16×10^{-4} , 1.58×10^{-4} , 1.3×10^{-4} , 7.9×10^{-5} y 5.3×10^{-5} moles/l. El curso de la reacción se obtuvo en cada caso, trazando en una gráfica el cambio de densidad óptica ($\Delta D.O.$) contra tiempo. Las velocidades iniciales quedan dadas por la pendiente en el punto inicial de la curva. Los recíprocos de estas velocidades se graficaron contra el recíproco de la concentración de sustrato, de acuerdo con Lineweaver-Burke, y de la gráfica se obtuvo la K_m de la enzima.

Concentración de la Enzima

La solución madre de la enzima se preparó pesando 40 mg de suero dializado durante 3 horas y disolviéndose en 3.0 ml de

agua bidestilada, con lo cual se obtiene una concentración de 7.0 mg de proteína por ml. A las diferentes incubaciones que se llevaron a cabo se les agregó 0.30 ml, 0.25 ml, 0.20 ml, 0.15 ml, 0.10 ml y 0.05 ml de la solución madre, o sea 2.8, 1.87, 1.50, 1.12, 0.74 y 0.31 mg de proteína, respectivamente.

Determinación del Peso Molecular

Se utilizó el método de centrifugación en un gradiente de sacarosa (18), comparando la sedimentación de la enzima con la de la albúmina de suero humano cuyo peso molecular es de 68 000.

La viscosidad y la densidad de una solución de sacarosa es tal, que en ella se observa una migración lineal de la mayoría de los materiales biológicos al centrifugar, por lo que la relación de las distancias recorridas por dos sustancias, a partir del menisco, es siempre constante:

$$R = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia 1}}{\text{distancia recorrida por la sustancia de referencia 2}}$$

La constante de sedimentación $\frac{S_1}{S_2}$ de dos sustancias es:

$$\frac{S_1}{S_2} = \left(\frac{PM_1}{PM_2} \right)^{2/3}$$

y en la mayoría de las proteínas es igual a R, de donde:

$$R = \left(\frac{PM_1}{PM_2} \right)^{2/3}$$

En esta forma, se puede calcular aproximadamente el peso molecular de una proteína, refiriéndola a otra de peso molecular conocido.

Gradiente de Sacarosa.- Las soluciones de sacarosa preparadas para hacer el gradiente fueron al 8% y 22%, en soluciones amortiguadoras de Tris-HCl 0.4 M, pH 8.6. Se pusieron 2.3 ml de solución al 8% en uno de los compartimientos del aparato descrito por Martín y Ames (18) y 2.3 ml de la solución al 22%, en el otro, para poder mezclar ambas soluciones en proporciones variables, colectándose directamente el gradiente obtenido en un tubo de centrifuga. Se prepararon 3 tubos con el mismo gradiente, con un volumen, en cada caso, de 4.6 ml. En los tubos I y II se pusieron 0.1 ml de suero, disuelto en solución amortiguadora Tris-HCl 0.4 M, pH 8.6, que contenía 7 mg de suero dializado durante 3 horas, lo que corresponde aproximadamente a 3.5 mg. de proteína; en el tubo III se puso 0.1 ml de albúmina que contenía 3 mg de proteína, quedando así, en cada tubo, un volumen total de 4.7 ml.

Se centrifugaron los tubos en una centrifuga Spinco con cabezal Sw 39 L, durante 16 horas a 35 000 rpm, a una temperatura de 0°C y al terminar se perforó cada uno de los tubos en su parte inferior, con una aguja, colectándose fracciones de 12 gotas en tubos enfriados en hielo. A las fracciones con suero (que provenían de los tubos I y II) se les midió actividad enzimática, localizándose así la fracción más activa a la que se le calculó su distancia al menisco.

En las fracciones del tubo III, es decir, el que contenía la albúmina, se localizó la fracción de mayor concentración de proteína por el método de Folin-Ciocalteu (16), la que sirvió para comparación con la fracción más activa de los tubos I y II.

RESULTADOS

1.- Identificación de la Enzima

a).- El color que se obtiene en la reacción de Sibley se debe a las 2, 4-dinitrofenilhidrazonas de las triosas formadas por la acción de la aldolasa. Al aplicar este método al suero total de látex de Hevea brasiliensis hubo desarrollo de coloración, lo que indicó la presencia de aldolasa.

b).- La presencia de esta enzima puesta en evidencia por el método de Sibley, fue también corroborada determinándose el fósforo liberado de las triosas formadas por el método de Fiske y Subbarow. Tomando como ejemplo uno de los resultados obtenidos, se ve que al cabo de 15 minutos se produjeron 106 μ g. de fósforo.

2.- Purificación

a).- Columna de Sephadex G-100.-- Este método no dio resultado, pues en las fracciones que se obtuvieron no se logró purificación e inclusive se perdía actividad. Un ejemplo de este intento de purificación se muestra en la tabla 2.

b).- Precipitaciones con Sulfato de Amonio.-- Cuando se trató de purificar por precipitaciones con sulfato de amonio a distintas saturaciones, la máxima purificación fue de 1.94 x, pero de la fracción que tuvo esta purificación sólo se lograron recuperar 4.7 mg de proteína a partir de 52 mg. Los datos experimentales de esta purificación se encuentran en la tabla 3.

Tabla 2

Fracción	Volumen Total <u>en ml.</u>	Actividad Total <u>en unidades</u>	Proteína Total <u>en mg.</u>	Actividad especifica <u>unidades/mg P</u>	Recupe- ración <u>%</u>	Factor de Purifica- <u>ción</u>
Suero Total 1 gr	6.0	4.50×10^{-1}	246	1.83×10^{-3}	100	1
Sobrenadante de pH 5 dializado	6.4	1.61×10^{-1}	141	1.14×10^{-3}	3.5	.62
Filtración en gel Sephadex G-100	5.8					
Fracción I(15 mg)		6.25×10^{-3}	15	4.24×10^{-4}	1.03	.23
Fracción II(24 mg)		1.93×10^{-1}	18	1.07×10^{-2}	4.2	5.8
Fracción IIa						
Fracción III	No hay actividad.					

Tabla 3

Fracción	Volumen Total <u>en ml.</u>	Actividad Total <u>en unidades</u>	Proteína Total <u>en mg.</u>	Actividad Específica <u>unidades/mg P</u>	Recupe- ración <u>%</u>	Factor de Purifica- <u>ción</u>
Suero Total 200 mg.	3.0	9.52×10^{-2}	52	1.83×10^{-3}		
Suero dializado	3.3	3.09×10^{-2}	25.6	1.21×10^{-3}	100	1
Precipitado con sulfato de amonio al 50% de sat.	2.5	1.4×10^{-2}	14.0	1.03×10^{-3}	45.3	.85
Precipitado con sulfato de amonio al 60% de sat.	2.5	8.4×10^{-3}	5.25	1.6×10^{-3}	27.2	1.3
Precipitado con sulfato de amonio al 80% de sat.	2.5	1.11×10^{-2}	4.75	2.34×10^{-3}	35.9	1.94

Tabla 4

Fracción	Volumen Total <u>en ml.</u>	Actividad Total <u>en unidades</u>	Proteína Total <u>en mg.</u>	Actividad Específica <u>unidades/mg P</u>	Recupe- ración <u>%</u>	Factor de Purifica- <u>ción</u>
Suero dializado	2.5	8.58×10^{-2}	116	7.4×10^{-4}	100	1
Precipitado con sulfato de amonio al 40%	2.5	0	5.5	0	0	0
Precipitado con sulfato de amonio al 51%	2.5	4.9×10^{-3}	7.45	6.57×10^{-4}	5.7	.88
Precipitado con sulfato de amonio al 61%	2.5	2.8×10^{-3}	3.62	7.84×10^{-4}	3.2	1.05
Precipitado con sulfato de amonio al 70%	2.5	1.68×10^{-2}	4.25	3.96×10^{-3}	19.5	5.4
Precipitado con sulfato de amonio al 80%	2.5	2.5×10^{-3}	2.5	1.01×10^{-3}	2.9	1.4

c).- Método de Stumpf.— En la fracción precipitada con sulfato de amonio entre 61% y 70% de saturación se obtuvo una purificación de 5.4 x. Se trató, por tanto, de seguir adelante el método precipitando esta fracción con acetona hasta el 50%, pero se perdió la actividad. (Ver datos en la tabla 4).

Como se observa en las tablas anteriores, la cantidad de enzima en el suero total es muy baja (actividad total en unidades), por lo que su purificación resulta un tanto difícil trabajando con cantidades pequeñas de material. Para lograr una purificación efectiva, sería conveniente tratar cantidades mucho mayores de suero, lo cual no fue posible dado que sólo se disponía de pequeñas cantidades de látex.

3.- Identificación de la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en el Suero

Al efectuarse experimentos en los que se suprimió la adición de deshidrogenasa de músculo de conejo, se observó que la reacción proseguía perfectamente, por lo que se pensó que esta enzima podía estar presente en el suero. Los resultados se resumen en el siguiente cuadro:

Exp.	Substrato	Cofactor NAD NADP	G ₃ FD	Suero	Actividad Específica
1	di F 1-6 F	+	+	+	5.41 x 10 ⁻⁴
2	"	+	-	+	4.14 x 10 ⁻⁴
3	"	+	+	+	6.97 x 10 ⁻⁴
4	"	+	-	+	8.08 x 10 ⁻⁴

Los experimentos número 2 y 4 demuestran que la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa sí está presente en el suero, ya que las actividades son comparables con las de los experimentos en los que sí se adicionó la deshidrogenasa a la incubación (1 y 3).

4.- Cofactor de la Enzima

En los experimentos anteriores, se observó además, que las reacciones acopladas con NADP (3 y 4) son más activas que las acopladas con NAD (1 y 2). Esto confirma lo reportado por Gibbs (19), que los tejidos de las plantas contienen dos triosa-fosfato-deshidrogenasas, una que utiliza el NADP como cofactor y otra el NAD. En las hojas se encuentran ambas enzimas mientras que en las raíces y semillas, sólo la enzima dependiente del NAD. Se puede decir que la aldolasa del suero de látex de Hevea es dependiente tanto del NAD como del NADP, presentando con éste mayor actividad. Cuando se midió la actividad endógena del suero, omitiendo el sustrato y empleando NAD y NADP, la reducción de este último fue mayor y la adición de sustrato a ambas incubaciones, después de corto tiempo, produjo un incremento muy grande en la actividad (Fig. 1).

5.- Efecto de la Diálisis

La diálisis tuvo por objeto eliminar la actividad endógena, debida probablemente a sustratos presentes en el suero. Después de la diálisis se observó un aumento en la actividad, por haberse eliminado quizás, sustancias no convenientes para la reacción (Fig. 2).

Se efectuaron diálisis de 1 y 3 horas, obteniéndose mejores resultados con la de 3 horas.

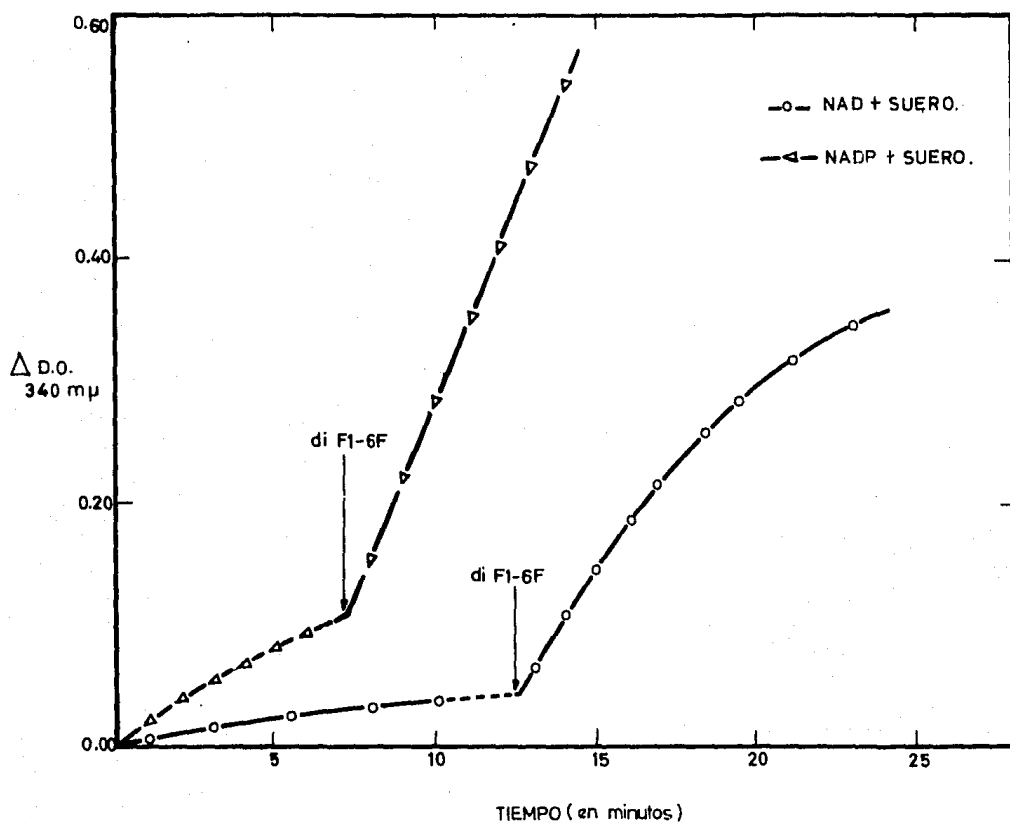


FIG. 1.-

Actividad Endógena del Suero.
 Reducción del NAD y NADP añadido a-
 la incubación en ausencia de sustrato.
 Las flechas indican el momento en que-
 se adicionó el sustrato.

6.- pH Optimo

Debido a que en la reacción acoplada hay liberación de H^+ al medio que modifican el pH de la incubación, se decidió, para la determinación del pH Optimo de la aldolasa del suero, aumentar la capacidad amortiguadora de las soluciones incrementando su molaridad de 0.1 a 0.4. El pH óptimo de la aldolasa del suero es de 8.5 (Fig. 3).

En la tabla 5 se indica el pH de la solución amortiguadora, el pH final de la incubación y la actividad de la enzima.

Tabla 5

<u>Solución</u> <u>Amortiguadora</u>	<u>pH</u>	<u>pH Cisteína</u>	<u>pH Final de la</u> <u>Incubación</u>	<u>Actividad</u> <u>Específica</u>
Citratos	3.15	3.0	4.35	1.69×10^{-4}
"	4.65	4.0	5.85	1.99×10^{-4}
"	5.4	5.0	6.6	2.26×10^{-4}
Tris-HCl	6.93	6.0	7.7	8.51×10^{-4}
"	7.8	7.0	8.0	6.25×10^{-4}
"	8.6	8.0	8.5	<u>15.4×10^{-4}</u>
"	9.2	9.0	9.0	13.1×10^{-4}
Glicina	9.2	9.0	9.0	13.2×10^{-4}
"	10.3	10.0	9.5	13.7×10^{-4}
"	11.2	11.0	9.9	10.4×10^{-4}

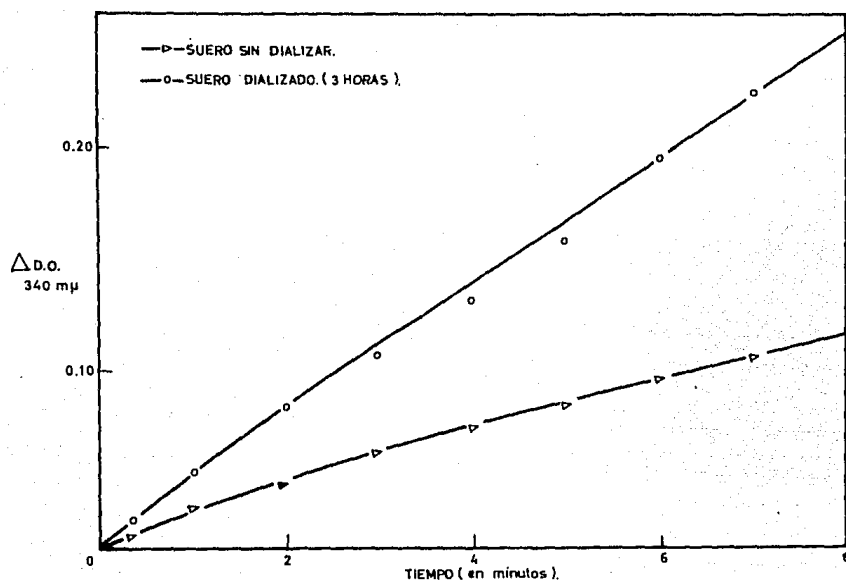


FIG. 2.-
Efecto del tiempo de diálisis sobre
la actividad de la Aldolasa.

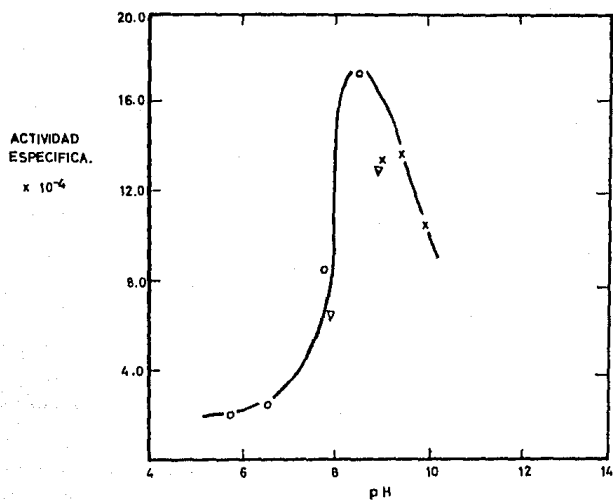


FIG. 3.-
Efecto de pH sobre la actividad
de la Aldolasa del suero del látex.
Soluciones amortiguadoras de: (o)-citratos 0.4 M, (Δ)- Tris HCl 0.4 M y (x)-glicina 0.4 M.

7.- Estabilidad de la Enzima

Al guardar el lote de suero dializado, disuelto en agua bi-destilada, a una temperatura de 5°C durante 11 días, su actividad disminuye muy poco, lo que indica que la actividad catalítica tanto de la aldolasa como de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es bastante estable, como puede verse en la Fig. 4.

8.- Constante de Michaelis-Menten

Al aplicar la ecuación modificada por Lineweaver y Burke (20) a los datos experimentales, se obtuvo el valor de la K_m de la aldolasa para el difosfato 1-6 de fructosa que es igual a 3.15×10^{-5} M (Fig. 5).

9.- Efecto de la Concentración de la Enzima

La actividad de la aldolasa del suero aumenta proporcionalmente a la cantidad de enzima empleada en las incubaciones, lo que indica que en el suero no existe ningún factor que modifique el comportamiento de esta enzima (Fig. 6).

10.- Peso Molecular Aproximado

La mayor actividad enzimática en los tubos I y II se encontró, en ambos casos, en la fracción 12. La mayor concentración de albúmina del tubo III se localizó en la fracción 18 (Fig. 7). En los tres casos se calculó la distancia al menisco siendo la

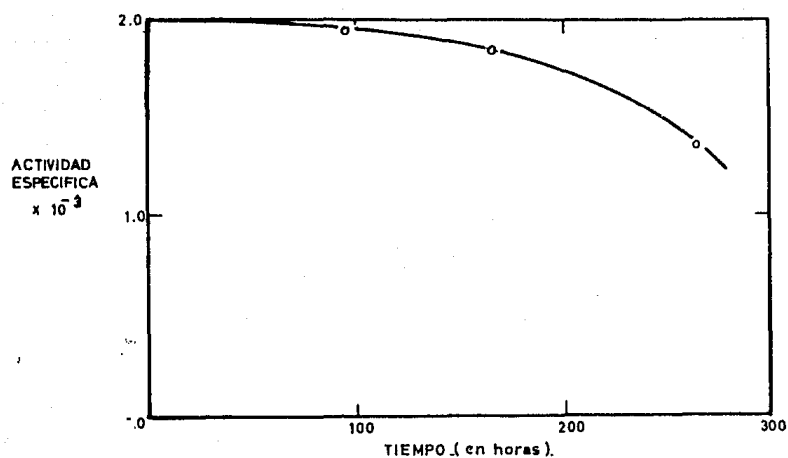


FIG. 4.-
Estabilidad de la Enzima
a 5° C.

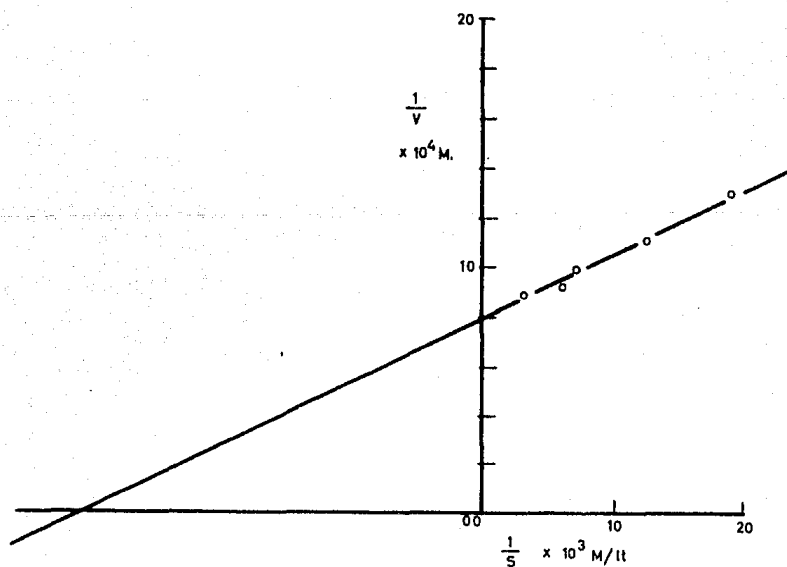


FIG. 5.-
Gráfica de la Ecuación de Lineaweaver y
Burke para el cálculo de la Km de la Al-
dolasa del suero del látex con respec-
to al difosfato 1-6 de fructosa.

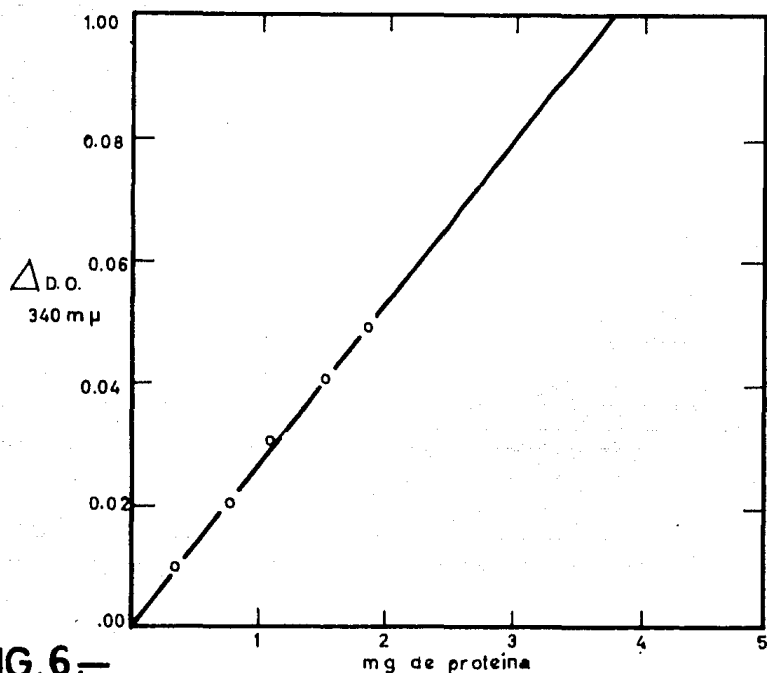


FIG. 6.—
Efecto de la concentración de la
Enzima.

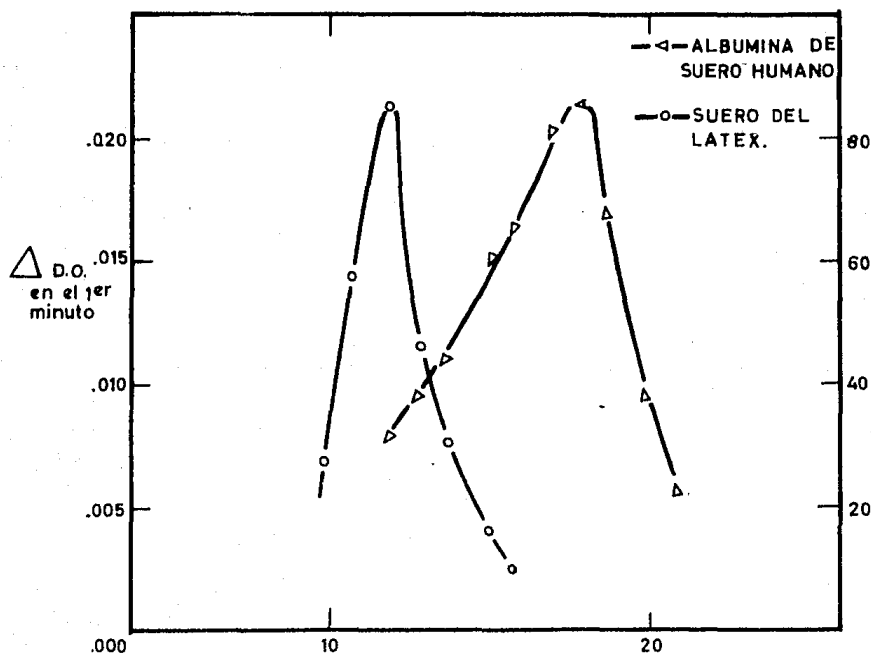


FIG. 7.—
Gráfica de la Sedimentación de la Aldolasa —
del Suero, y de la Albúmina de Suero Humano.

relación de las distancias de la aldolasa y de la albúmina

$$R = \frac{2.17617}{1.13817} = 1.9112$$

que es también la relación de los pesos moleculares. Al sustituir los datos experimentales en la ecuación correspondiente el peso molecular de la aldolasa de Hevea es de 182 000 $\pm$ 15%, parecido al reportado para la aldolasa del músculo que es de 147 000 a 180 000.

CONCLUSION

En un trabajo previo realizado en este laboratorio (3) se demostró la presencia de una láctico deshidrogenasa muy activa en el suero de látex de Hevea. Esta información, la presencia de aldolasa y de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa reportada en el presente estudio y datos experimentales no publicados, que prueban la existencia de una hexoisomerasa, muestran que en el suero existen enzimas pertenecientes al ciclo de la glucolisis.

La participación de estas enzimas y sus substratos, en el metabolismo del látex de Hevea, no se ha esclarecido aún y se requieren otros estudios para poder decidir cuál es la función de éste en los vegetales.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Miller, M. W. The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites, pág. 155 (1958).
- 2.- Arreguin, B. Encyclopedía of Plant Phisiology. Rushland. pág. 223.
- 3.- Watanabe, S. T. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias U.N.A.M. 1964.
- 4.- Dixon, M. y Webb, E. C. Enzimes. Longmans pág. 630.
- 4a.- " " " " " " " " pág. 641.
- 4b.- " " " " " " " " pág. 533.
- 5.- Stumpf, P. K. J. Biol. Chem. 176, 233 (1948).
- 6.- Baba, T. Biochem. 275, 248 (1943).
- 7.- Allen, R. New Phytologist. 39, 335 (1940).
- 8.- Dixon, M. y Webb, E. C. Enzimes. Longmans pág. 480.
- 9.- Rutter, W. J. The Enzimes. Academic Press, New York. Londres. Vol. 5, pág. 352 (1961).
- 10.- Tung, T., Ling R., Byre, N. L., Lardy, H. A. Biochem. et Biophys. Acta 14, 488 (1954).
- 11.- Wolf, H. P. y Leuthardt, F. Helv. Chim. Acta 40, 237 (1957).
- 12.- Sibley, J. y Lehninger, A. J. Biol. Chem. 177, 859 (1949).

- 13.- Umbreit, W. W., Burris, R. H., Stauffer, J. F. *Marometrics Techniques*. pág. 272.
- 14.- Taylor, F. J. *Methods in Enzimology*. Vol. I, pág. 310.
- 15.- Layne, R. *Methods in Enzimology*. Vol. III, pág. 450.
- 16.- Kabal y Mayer. *Experimental Immunochemistry*, pág. 321.
- 17.- Gomori, G. *Methods in Enzimology*. Vol. I, págs. 138-146.
- 18.- Martin, R. G. y Ames, B. N. *J. Biol. Chem.* 236, 1372 (1961).
- 19.- Gibbs, M. *Methods in Enzimology*. Vol. I, pág. 411.
- 20.- Dixon, M. y Webb, E. C. *Enzymes*. Longmans págs. 75 a 77.