



GLICERALDEHIDO-3-FOSFATO DESHIDROGENASA EN EL LATEX DE

Hevea brasiliensis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

JORGE SALAZAR DEL RIO

México, D. F., 1966



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 L.

~~1189~~

03396

## I N D I C E

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

## INTRODUCCION

El látex se considera como resultado de un proceso de metabolismo general de las plantas (1) y se encuentra dentro de los tubos y vasos laticíferos; los primeros se ramifican a través de los tejidos de las plantas y los vasos laticíferos tienen el mismo origen que los vasos del xilema. El látex es un fluido acuoso que sale cuando se dañan los vasos laticíferos, como un exudado viscoso blanco o amarillo, cuyas funciones no han sido determinadas, pero que se supone que por lo menos una de ellas es como cicatrizante.

Las partículas del látex se hallan en el citoplasma y en las vacuolas, la composición varía de unas especies a otras y desde luego no todos los látex contienen hule.

En la composición química del látex se han reportado varios ácidos y sales minerales, azúcares, almidón, proteínas, alcaloides, resinas, gomas y aceites esenciales.

El hule es un producto natural y químicamente es un poliisopreno lineal, estando las unidades de isopreno polimerizadas "cabeza" con "cola"; su configuración es "cis" y el grado de polimerización es de 3,000 a 6,000 unidades. La planta que produce la mayor cantidad de hule natural en el mundo es la Hevea brasiliensis de la familia de las Euforbiáceas.

En la biosíntesis del hule existe un paso intermedio irreversible que es la formación del ácido mevalónico (precursor de todas las sustancias poli-isoprenoides) (2), el cual se forma por la condensación de moléculas de acetil CoA que produce el ácido  $\beta$ -hidroxi  $\beta$ -metil glutárico el cual, por la reduc-

ción, da origen al ácido mevalónico, a partir del cual se sintetizan casi todos los compuestos terpénicos.

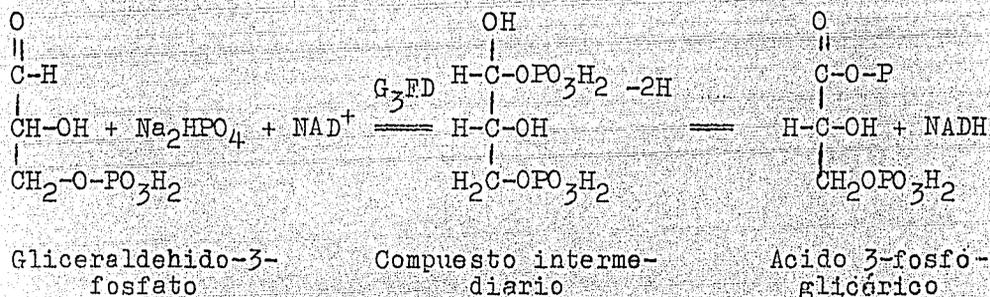
Este proceso es bastante complejo y en él intervienen varias enzimas. En el látex existe evidencia experimental de la presencia de varios ciclos metabólicos, entre ellos el de la glucólisis y probablemente el de las pentosas, habiéndose identificado en el látex varias enzimas de dichos ciclos metabólicos. Uno de los aspectos más interesantes del látex es la biosíntesis del hule, que es la secuencia de reacciones que conduce a su formación a partir de intermediarios más sencillos.

Entre las enzimas reportadas se encuentran la fosfatasa (3), la deshidrogenasa láctica (4) y la aldolasa (5).

En este trabajo se identificó y estudió la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

## GENERALIDADES

En el látex de Hevea brasiliensis, una vez rota la emulsión, se separa una porción acuosa (suero) donde se han encontrado enzimas, entre ellas la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa ( $G_3FD$ ), motivo de este trabajo. Esta enzima, en condiciones apropiadas cataliza la oxidación del gliceraldehido-3-fosfato a ácido fosfoglicérico con formación de un compuesto intermediario, actuando como coenzima el  $NAD^+$ , que en la reacción se reduce pasando a  $NADH$ . La reacción se lleva a cabo a un pH fisiológico y en presencia de fosfato inorgánico:



La  $G_3FD$  ha sido aislada de levadura (6), en forma cristalina, por fraccionamiento con sulfato de amonio y del músculo esquelético de conejo (7), también por precipitación con sulfato de amonio a distintas concentraciones.

Han sido reportados pesos moleculares diferentes para esta enzima, así, en (8) se reporta para la  $G_3FD$  de músculo de conejo un peso molecular de 137,000 y para la  $G_3FD$  de levadura, 119,000 (9); se reporta 140,000, en presencia de EDTA, por el método de luz dispersada y 118,000, en ausencia de EDTA, obtenido por sedimentación y difusión.

El peso molecular más aceptado (7) es de 140,000 sugiriéndose por diversos estudios que la enzima está constituida por 4 subunidades de peso molecular de 35,000, dando un peso total de 140,000.

Se ha investigado el contenido en la enzima de iones metálicos (8), reportándose en la Tabla I el contenido del metal en miligramos por gramo de proteína.

T A B L A I

	Zn	Cu	Fe	Ni	Mn	Cr	Al	Mg	Ca	Sr	Ba	Pb
G <sub>3</sub> FD (músculo de conejo)	813	55	62	-	12	-	5	88	112	-	7	-
G <sub>3</sub> FD (leva- dura)	295	111	907	-	7	-	15	316	120	trazas	3	-

Las actividades específicas reportadas para la G<sub>3</sub>FD (7) se encuentran en la Tabla II y son variables. Los valores de la velocidad de reacción se determinaron en presencia de exceso de D-gliceraldehido-3-fosfato, NAD<sup>+</sup> y Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>.

T A B L A II

	pH	T° C	Actividad específica (μ moles de NAD/min/mg)
Cori, Slein y Cori (1948)	8.6	27	67
Beisenherz y col. (1953)	8.7	--	41
"	7.5	--	24
Koeppe, Boyer y Stulberg (1956)	8.6	27	158*

\*El Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> fue reemplazado por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

	pH	T° C	Actividad específica ( $\mu$ moles de NAD/min/mg)
Astrachan, Colowick y Kaplan (1957)	8.5	28	54 (%)
	8.5	28	88 (máx)
Czok y Bücher (1960)	-	25	92

En algunos casos la  $G_3FD$  se ha aislado asociada con el  $NAD^+$ .

El sustrato normal de la enzima es el gliceraldehido-3-fosfato, pero en altas concentraciones de enzima, algunos aldehidos no fosforilados actúan como sustrato. El  $NAD^+$  no puede ser sustituido por el  $NADP^+$ . El pH óptimo se encuentra entre 8.6 y 9.0. La constante de Michaelis ( $K_m$ ) es  $5.1 \times 10^{-5}$  M. (10).

Abreviaturas utilizadas en el presente trabajo:

$G_3F$	Gliceraldehido-3-fosfato.
$G_3FD$	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.
$NAD^+$	Dinucleótido de nicotínamida-adenina reducido.
EDTA	Acido etilen diamino tetracético.
TEA	Trietanolamina.

## PARTE EXPERIMENTAL

## MATERIAL

## Obtención del material enzimático.

El látex de Hevea brasiliensis se obtuvo del campo experimental "El Palmar", situado entre los Estados de Oaxaca y Veracruz, a 18°, 32' latitud norte y 96° 47' longitud oeste y corresponde a la zona tropical. La precipitación anual es de 2,000 mm ó más, con una temperatura media de 25° y una época de sequía. Según la clasificación de Koeppen, el clima corresponde al tipo A(m)gi y la vegetación es de bosque tropical con vegetación primaria: Terminalia amazonia, Scheelea liebmanii, desapareciendo por implantación de Hevea brasiliensis estratos herbáceos como Protalaria sp., Pueraria javanica y algunas especies de gramíneas.

El látex se colectó directamente de los árboles en frascos de polietileno, congelándose instantáneamente el látex, en cuya forma fue remitido del campo experimental al laboratorio, a donde llegó unas horas después de colectado; de este modo se evita la desnaturalización del material proteico presente en el látex. El mismo día en que fue colectado se procedió a trabajarlo.

## METODOS.

1) Preparación de la fracción que contiene la enzima.

El látex, una vez descongelado, se centrifugó a 5° C en una ultracentrífuga preparativa Beckman, modelo L-2 HV, utilizando el cabezal No. 30 y una velocidad de 29,000 rmp. durante 45 min.

Mediante la centrifugación se separaron 4 capas, 3 de -- ellas se distinguen fácilmente y la otra se observa difícilmen te:

1.- Una capa superior, de consistencia sólida, de color blanco marfil, correspondiente al hule y con un porcentaje de 42% del látex (depende de la época del año en que se colecta y de la madurez de los árboles).

2.- Inmediatamente debajo y adherida a la anterior se encuentra una capa muy delgada de color anaranjado.

3.- La siguiente es una solución clara, que llamamos suero; constituye el 57% del látex y es la fuente del material en zimático empleado.

4.- La última fracción, en muy pequeña cantidad, es de color pardo, quedando adherida al fondo del tubo como un residuo sólido de aspecto vítreo.

El suero se liofilizó y se guardó en el desecador a 5° C.

## 2) Determinación de proteínas.

La cantidad de proteínas presentes en el suero se determinó por los métodos de Biuret (12) o de Folin-Ciocalteu (13).

Método de Biuret. Se basa en la formación de un complejo púrpura con las sales de cobre en solución alcalina, en las sustancias que contienen dos o más uniones peptídicas. Las de terminaciones de proteína por el método de Biuret se hicieron como sigue:

A 0.5 ml de solución de proteína, se añadieron 1.5 ml de agua y 4 ml de reactivo de biuret y se comparó con un control de 2 ml de agua destilada más 4 ml del mismo reactivo. Al momento de agregar este último se agitan las soluciones y se deja desarrollar el color durante 30 minutos. En seguida se leen

las extinciones en el espectrofotómetro, a 540 m $\mu$ , utilizando un control doble para ajustar la escala a 0 y a 100% de trasmisión. Las lecturas de densidad óptica se convierten a mg de proteína por comparación con una curva de calibración hecha con albúmina de suero humano cristalizada.

Método de Folín-Ciocalteu. En este método el color resultante se debe a la reacción de biuret de la proteína con el cobre y la reducción del reactivo fosfotungsto-fosfomolibdico por la tirosina y triptofano presentes. Se incuban 2 ml de solución problema, con 6 ml de carbonato de sodio al 12.5% y 1 ml de sulfato de cobre al 0.1%; después de 1 hora se adiciona 1 ml de reactivo de Folín y se deja desarrollar el color durante 30 minutos leyéndose a 650 m $\mu$ . Las lecturas obtenidas se convierten en mg de proteína mediante una curva de calibración hecha con albúmina de suero humano cristalizada.

### 3) Medida de la actividad enzimática.

Se hizo espectrofotométricamente usando un espectrofotómetro automático de doble haz, Perkin-Elmer, modelo 450 y la determinación se basa en la característica de que el NADH formado en la reacción enzimática absorbe a 340 m $\mu$ .

#### Definiciones.

Actividad total en unidades: actividad específica x proteína total en mg.

Actividad específica: moles de sustrato/min/mg de proteína.

### 4) Condiciones de la incubación.

0.2 ml de  $G_3F$  0.3 M (0.01 ml de  $G_3F$  + 0.19 de solución amortiguadora de glicina-NaOH 0.2 M, pH 10.6).

- 0.6 ml de TEA\* 0.040 M, pH 10.7.
- 0.3 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ \*\* 0.050 M, pH 8.9.
- 0.6 ml de EDTA 0.0002 M.
- 0.2 ml de  $\text{MAD}^+$  0.01 M.
- 0.1 ml de solución acuosa de enzima (10 mg/ml).
- 1.0 ml de agua destilada.

El control lleva todas las sustancias con excepción del sustrato ( $\text{G}_3\text{P}$ ), en su lugar se agregó la solución amortiguadora glicina-NaOH; todos los componentes del control se pusieron en un volumen doble al de la incubación por ser necesario calibrar el aparato a 0 y 100% de transmitancia con 2 celdas que contengan el control. Una vez calibrado el aparato se quita una de las celdas y en su lugar se pone la solución problema. La reacción se inicia agregando la enzima y se toma como tiempo 0, el instante en que cae la primera gota.

- TEA\* - Como solución amortiguadora en vez de cisteína
- $\text{Na}_2\text{HSO}_4$ \*\* - Se utilizó en lugar de  $\text{Na}_2\text{HASO}_4$ .

##### 5) Calibración del aparato para las cinéticas.

- 1.- Se usó la lámpara de deuterio para el rango del UV en el cual se corrieron las cinéticas.
- 2.- El aparato se ajustó al tiempo de duración de la cinética. Para esto se usó un aditamento especial controlador del tiempo. Normalmente el tiempo de reacción, dada la actividad de la enzima, fue de 9.25 minutos.
- 3.- La longitud de onda se mantuvo constante a 340  $\mu$ .
- 4.- Se ajustó la escala con los controles a 0 y 100% de T.
- 5.- En las ventanas de referencia y muestra, se colocaron los controles, ajustándose nuevamente la escala a 0 y 100% de T.

6.- Se sacó la celdilla de la ventana correspondiente a la muestra.

7.- Al mismo tiempo que se inició la adición de la enzima en la celdilla con la mezcla de reacción, el aparato registrador se puso en marcha y al terminar la adición la celdilla se agitó y se colocó en la ventana correspondiente, poniéndose la plumilla en posición de escribir sobre el papel. La curva resultante se extrapola a tiempo cero. Se tomó únicamente el primer minuto de la reacción para calcular la actividad inicial, ya que se supone que en este tiempo es cuando la enzima actúa sin interferencia de otras sustancias presentes.

#### Purificación de la enzima.

El método utilizado fue el de precipitación con sulfato de amonio a distintas concentraciones.

10 g de suero liofilizado, disueltos en 30 ml de EDTA 0.050 M ajustado a pH 7, se dializó durante 2.30 horas, al cabo de las cuales se liofilizó. 1.895 g del mismo se disolvieron en 20 ml de EDTA y en una alícuota de 0.2 ml, que se llevó a 1 ml con agua destilada, se midió actividad y proteínas. La primera precipitación se hizo con 250 mg de sulfato de amonio por ml que corresponde a una concentración de 40%; se centrifugó a 40,000 rpm durante 20 minutos a 0° C, obteniéndose un precipitado y un sobrenadante. El primero se disolvió en un volumen mínimo de EDTA, en este caso 7 ml, después se dializó en agua bidestilada, agregando a esta 50 ml de EDTA, durante 2.30

EDTA - Se empleó como agente secuestrante de los iones metálicos, evitando en esta forma alguna posible inhibición de la actividad enzimática.

horas, con el fin de eliminar el sulfato de amonio; al término de la diálisis se liofilizó para determinar su actividad y contenido de proteína. Se midió el volumen del sobrenadante y se precipitó con 125 mg de sulfato de amonio por ml, que corresponde a una concentración final de 60%; se centrifugó en las mismas condiciones que en la precipitación anterior. El precipitado se disolvió en 7 ml de EDTA, se dializó y liofilizó. Nuevamente se midió el volumen del sobrenadante y se precipitó con 62.5 mg x ml de sulfato de amonio, que corresponde a una concentración de 65%. El precipitado obtenido se disolvió en 5 ml de EDTA, se dializó y liofilizó. El sobrenadante se volvió a precipitar con 62.5 mg/ml de sulfato de amonio, correspondiendo a una concentración de 73%. El precipitado se disolvió en 5 ml de EDTA y se dializó y liofilizó, al igual que el sobrenadante.

Para observar el efecto de la concentración de la enzima sobre la actividad enzimática se utilizó suero dializado. Se dializaron 5 g de suero total, disueltos en 16 ml de EDTA 0.050 M, pH 7, durante 5 horas a 5° C. La solución madre se preparó a una concentración de 10 mg/ml. Se usaron 4 incubaciones conteniendo 0.25, 0.5, 1.0, 1.25 mg de suero dializado que corresponden, respectivamente, a 0.220, 0.430, 0.740, 0.920 mg de proteína.

#### Determinación de la constante de Michaelis-Menten.

Se determinó variando la concentración del sustrato y utilizando enzima parcialmente purificada. De la solución madre (conteniendo 5 mg de sustrato  $G_3F$  en 1 ml de solución amortiguadora de glicina NaOH 0.2 M, pH 10.6, que corresponde a una molaridad de 0.03 M). Se tomaron 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, y 0.2

ml para las incubaciones correspondiendo respectivamente, a  $0.098 \times 10^{-3}$ ,  $0.196 \times 10^{-3}$ ,  $0.490 \times 10^{-3}$ ,  $0.980 \times 10^{-3}$  y  $1.960 \times 10^{-3}$  mol/l. La velocidad inicial se obtuvo extrapolando a tiempo cero la gráfica obtenida y tomando únicamente el primer minuto. Las recíprocas de la concentración del sustrato se graficaron contra  $1/V$ , de acuerdo con Lineaweaver-Burke, obteniéndose así la  $K_m$  de la enzima.

#### 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 3 a 6.2

Solución A: Acido cítrico (84.04 g/l)

Solución B: Citrato de sodio (117 g/l)

b).- De fosfatos 0.4 M para un rango de pH 5.7 a 8.

Solución A: Fosfato de sodio monobásico (55.6 g/l)

Solución B: Fosfato de sodio dibásico (107 g/l)

c).- De Tris-HCl 0.4 M para un rango de pH 7.2 a 9.

Solución A: Tris (Trihidroximetilaminometano)  
(48.4 g/l)

Solución B: HCl 0.4 M

Mezclando volúmenes de las soluciones A y B se obtuvieron las soluciones amortiguadoras. Para determinar el pH óptimo se utilizó enzima parcialmente purificada. La TEA de las incubaciones fue ajustada a un pH cercano al de las soluciones amortiguadoras utilizadas. Al final de la reacción se midió el pH.

#### Determinación del peso molecular aproximado de la $G_3FD$ .

La determinación se hizo siguiendo el método de centrifugación con un gradiente de sacarosa (15). Se utilizó como re-

ferencia la albúmina de suero humano, del peso molecular de 68,000, y se comparó con el comportamiento de sedimentación de la enzima.

#### Preparación del gradiente de la sacarosa.

Se hicieron soluciones de sacarosa al 8 y 22% en solución amortiguadora Tris-HCl, pH 8.6, 0.4 M. Las soluciones se colocaron en los compartimientos del aparato descrito por Martin y Ames (15) en la siguiente proporción: 25 ml de la solución al 22% y 26 ml de la solución al 8% se mezclaron lentamente por agitación mecánicamente y se recibieron directamente en el tubo de la centrífuga con capacidad de 60 ml, obteniéndose de este modo el gradiente de sacarosa. El volumen final del tubo fue de 51.3 ml. Se repitió esta operación 3 veces, preparándose 3 gradientes. En el tubo 1 se puso 1 ml de Tris-HCl, en el tubo 2 se puso 1 ml de solución de albúmina (30 mg disueltos en Tris-HCl) y en el tubo 3 se colocó 1 ml de una solución de suero dializado (141 mg/ml de Tris-HCl). Esta solución contenía por cada 10 mg de suero dializado 6 mg de proteína. El volumen final de cada tubo fue de 52.3 ml.

Las soluciones se centrifugaron en el cabezal SW-25 durante 24 horas a 24,000 rpm, a una temperatura de 3° C. Al terminar la centrifugación se perforaron los tubos 2 y 3, colectándose respectivamente fracciones de 2 ml; a las fracciones del tubo 2 se les determinó concentración de proteína por el método de Folin-Ciocalteu (13), para localizar la fracción con mayor cantidad de proteína; a las fracciones del tubo 3 se les determinó actividad enzimática para localizar la máxima y a esta se le calculó la distancia al menisco.

## RESULTADOS

Purificación.

Las dialisis de cada fracción (Tabla III) no fue suficiente para eliminar completamente el sulfato de amonio haciéndose una diálisis posterior a la fracción más activa. La más alta purificación lograda fue de 6.7 veces la original, obteniéndose de esta fracción 90 mg, los cuales tuvieron 16 mg de proteína, con una recuperación en la actividad de 39.8%. Se nota además que la porción más activa de la enzima quedó en el sobrenadante.

Efecto de la diálisis.

Las actividades específicas del suero sin dializar y del suero dializado fueron de  $3.78 \times 10^{-9}$  y  $3.62 \times 10^{-9}$  moles/min/mg de proteína, respectivamente, observándose que difieren poco, lo que nos permite suponer que los iones metálicos presentes, los cuales pudieron haber sido eliminados por la diálisis, tienen poca influencia sobre la actividad de la enzima.

Efecto de la concentración de la enzima.

La actividad de la  $G_3FD$  aumenta proporcionalmente a su concentración (Fig. I), por lo que se concluye que no están presentes activadores e inhibidores en el suero.

T A B L A III

Fracción	Volumen total en ml (a)	Actividad total en unidades (b)	Proteína total en mg. (c)	Proteína en mg. (d)	Actividad específica unidades/mg P (e)	Recuperación % (f)	Factor de purificación (g)
Suero. dializado 1.895 g	20	$688.5 \times 10^{-9}$	270.0	13.50	$2.55 \times 10^{-9}$	100	1.0
Precipitado I	7	$105.7 \times 10^{-9}$	22.4	3.20	$4.72 \times 10^{-9}$	15.35	1.85
Precipitado II	7	$79.7 \times 10^{-9}$	51.1	7.30	$1.56 \times 10^{-9}$	11.57	0.61
Precipitado III	5	$70.3 \times 10^{-9}$	24.0	4.80	$2.93 \times 10^{-9}$	10.21	1.14
Precipitado IV	5	$95.5 \times 10^{-9}$	16.0	3.20	$5.97 \times 10^{-9}$	13.87	2.34
Sobrenadante	20	$273.9 \times 10^{-9}$	16.0	0.80	$17.12 \times 10^{-9}$	39.78	6.71

NOTA: Columna b = c x e

Columna f = como 100%

### Determinación de la constante de Michaelis-Menten.

Al aplicar la modificación de Lineweaver y Burke (16) a los datos obtenidos experimentalmente para una concentración de  $\text{NAD}^+$  de 0.01 M, se obtiene un valor de  $K_m$  de  $4.57 \times 10^{-5}$  M. (Fig.II).

### Determinación del pH óptimo.

Los resultados obtenidos indican que el pH óptimo aproximado de la enzima es de 7.5 (Fig. III).

### Determinación del peso molecular aproximado.

La mayor actividad se obtuvo midiendo el incremento de la densidad óptica en el primer minuto y correspondió al tubo 20. La mayor concentración de albúmina se obtuvo en el tubo 22. (Fig.IV).

Se calculó la distancia al menisco de los máximos, y de su relación se obtuvo para la  $G_3PD$  un peso molecular de 78,560.

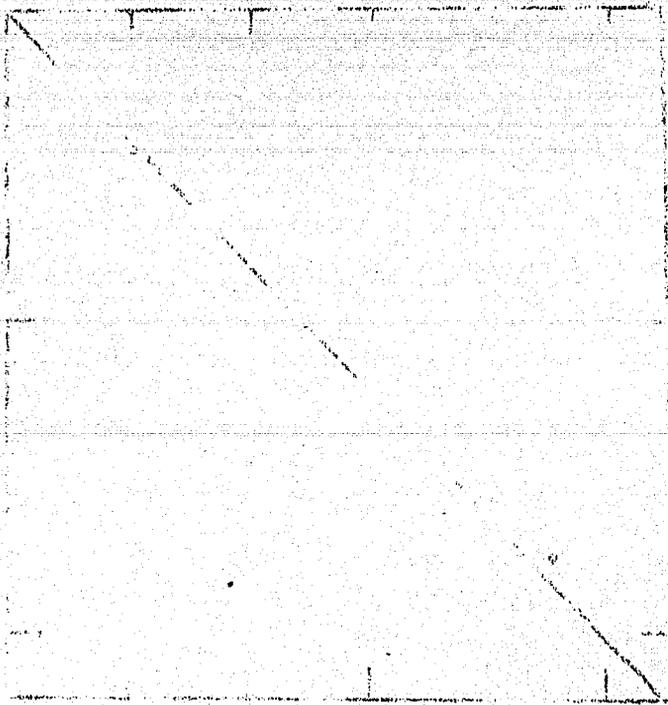
1.  $\frac{1}{2} \times 10 \times 10 = 50$   
 2.  $\frac{1}{2} \times 10 \times 10 = 50$   
 3.  $\frac{1}{2} \times 10 \times 10 = 50$   
 4.  $\frac{1}{2} \times 10 \times 10 = 50$

100

100 100 100 100

100 100 100 100

100 100  
 100



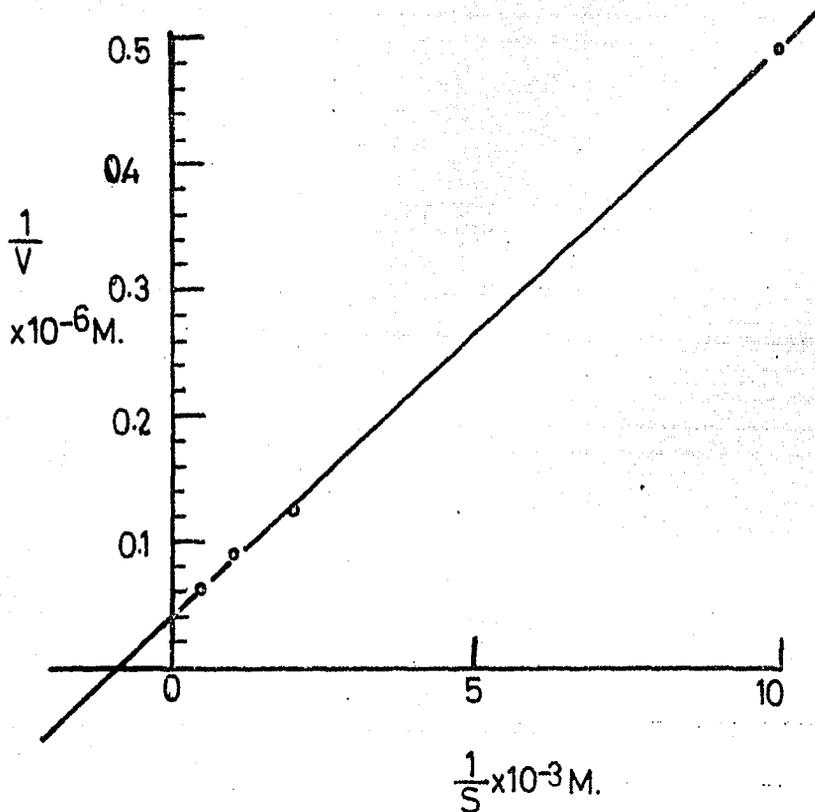


FIG II.- Gráfica de la Ecuación de Lineweaver y Burke para el cálculo de la  $K_m$  de la  $G_3FD$  del suero del látex con respecto al  $G_3F$ .

Act. esp.  
 $\times 10^{-9}$

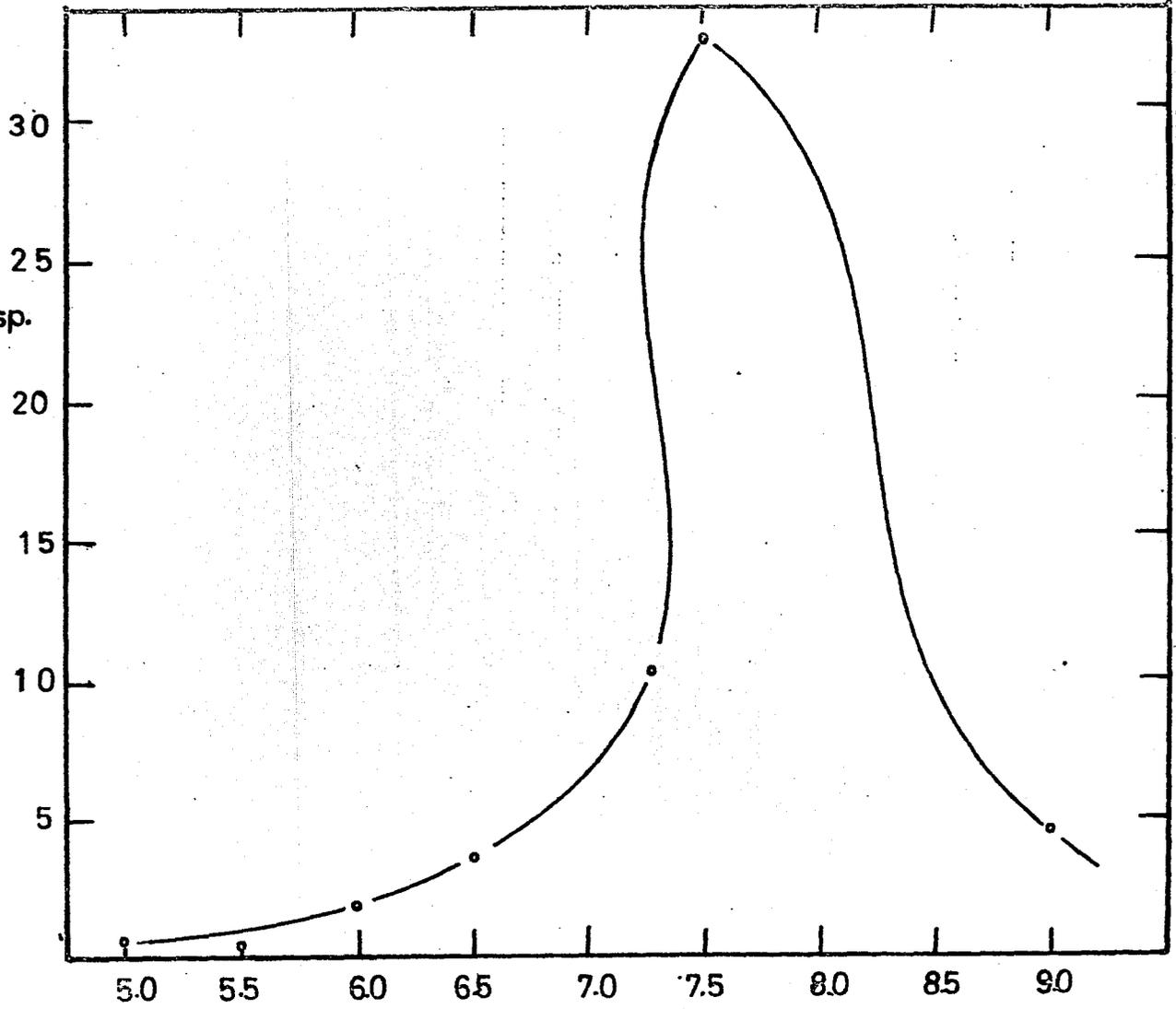
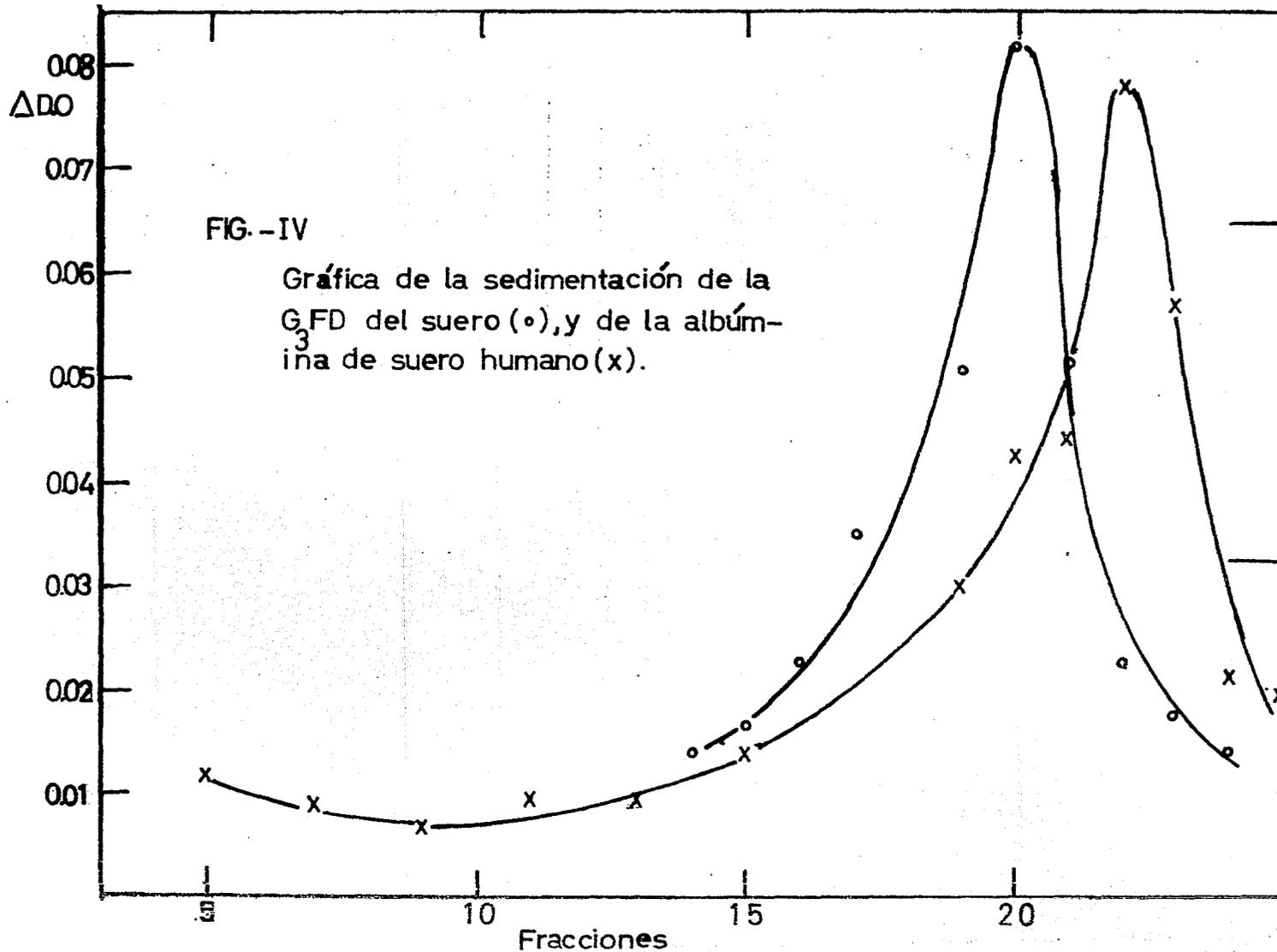


FIG.-III pH óptimo de la G<sub>3</sub>FD.

pH.



## CONCLUSIONES

En este trabajo se comprobó la existencia en el látex de la  $G_3FD$ , una enzima más que participa en la glucólisis. Esto, unido a lo reportado anteriormente en este Laboratorio (4) y (5), proporciona una base más firme para la existencia de la glucólisis en el látex de Hevea brasiliensis. En trabajos posteriores se completará el estudio de la totalidad de las enzimas glucolíticas presentes en el látex.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cobley, S. Leslie. An Introduction to the Botany Tropical Crops. Cap. XI, 317-324 (1963).
- 2.- Miller, M. W. The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites. Pág. 155 (1958).
- 3.- Arreguín, B. Encyclopedia of Plant Physiology. Rushland. Pág. 223.
- 4.- Watanabe, S. T. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U. N. A. M. 1964.
- 5.- Bustillos, A. G. A. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, U. N. A. M. 1965.
- 6.- Vanderheiden, B. S., Meinhart, J. O., Dodson, R. G. y Krebs, E. G., J. Biol. Chem. 237, 2095 (1962).
- 7.- Ferdinand, W. Biochem, J. 92, 578 (1964).
- 8.- Vallee, B. L., Hoch, F. L., Adelstein, S. J. y Wacker, W. E. C. J. Am. Chem. Soc. 78, 5879 (1956).
- 9.- Dandliker, W. B. y Fos, J. B., J. Biol. Chem. 214, 275 (1955).
- 10.- Velick, F. S. Methods in Enzimology. Vol. I, pág. 401.
- 11.- Taylor, F. J. Methods in Enzimology. Vol. I, pág. 310.
- 12.- Layne, R. Methods in Enzimology. Vol. III, pág. 450.
- 13.- Kabal y Mayer. Experimental Immunochemistry, pág. 321.
- 14.- Gomori, G. Methods in Enzimology. Vol. I, pág. 138-146.
- 15.- Martin, R. G. y Ames, B. N. J. Biol. Chem. 236, 1372 (1961).
- 16.- Dixon, M. y Webb, E. C. Enzymes. Longmans, págs. 75 a 77.