

CICLO DE LAS PENTOSAS EN EL LATEX DE *HEVEA BRASILIENSIS* MUELL*

B. Arreguín y M. C. Rock

Contribución N° 251 del Instituto de Química

Recibido, agosto 18 de 1967.

Al estudiar el metabolismo de una fracción pura del látex de *Hevea brasiliensis*, se identificaron la 6-P-glucosa deshidrogenasa, la 6-P-glucónico deshidrogenasa y la transcetolasa, enzimas cuya presencia no había sido descrita en este material; se aislaron e identificaron eritrosa, ribosa, ribulosa, fructosa, glucosa y sedoheptulosa (Esquema I), como productos de reacciones enzimáticas a partir de sus precursores; se comprobó la descarboxilación de la 6-P-glucosa mediante la utilización de C¹⁴ y se comprobó que al agregar NADP⁺, se reduce a NADPH.

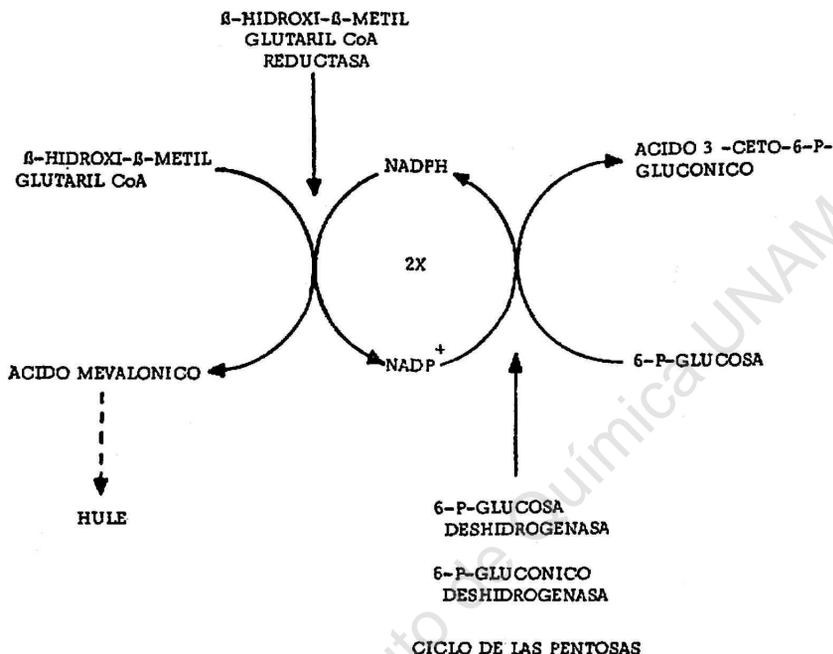
Estos resultados ligan a la formación de ácido mevalónico (y eventualmente del hule), descrita por Lynen (1), con el ciclo de las pentosas (2).

PARTE EXPERIMENTAL

El látex de *Hevea brasiliensis*** se colectó y congeló directa-

*Partes de este trabajo fueron utilizadas por María Cristina Rock como tesis para obtener el título de Químico en la Facultad de Química de la UNAM. Se utilizan las abreviaturas que se emplean en bioquímica, como P para fosfato; PP para pirofosfato; así como las abreviaturas comunes para las coenzimas, como NADP⁺; NADPH, etc.

**Agradecemos al Ing. Angel Vergara, Director del campo El Palmar, en Veracruz, su cooperación para suministrar el látex fresco con el que se llevó a cabo este estudio.



Esquema I

mente en frascos de polietileno colocados en termos llenos de CO_2 sólido.

El látex (2 a 3 l) se descongeló en porciones y se centrifugó a 29,000 rpm durante 45 minutos a 5° en una centrifuga preparativa Beckman, modelo L-2HV con rotor N^o 30. Se separaron 4 capas: la primera (42%), en la parte superior, de consistencia sólida, de color blanco marfil, que corresponde al hule. En la parte inferior de esta capa se encuentra otra muy pequeña de color anaranjado, en la que se identificó la presencia de sitosterol. La tercera es la más abundante (57%), y es un líquido claro, materia prima de este trabajo. Finalmente, hay una pequeña cantidad de un residuo sólido que queda adherido al fondo del tubo, de aspecto vítreo y de color pardo, que no se estudió.

La tercera fracción (*suero*) se liofilizó inmediatamente, hasta obtener un polvo blanco amorfo (9%) (*suero liofilizado*) que se guar-

dó en desecador a 5°. El contenido de proteínas en este polvo, determinado por el método de Biuret (3) o el de Lowry (4) varió entre 24 y 37%.

Se adquirieron en casas comerciales las sales de bario de 6-P-glucosa, ácido 6-P-glucónico, 5-P-ribosa y que se convirtieron a sus sales de potasio. Se adquirieron también la mezcla de 3-P-glicerol deshidrogenasa y 3-P-triosa isomerasa, 3-P-gliceraldehido deshidrogenasa, NAD⁺, NADH, NADP⁺, EDTA, 6-P-¹⁴C glucosa (sal de bario), polidasa-S y Tris [Tris (hidroximetil) amino metano].

Acondicionamiento del suero liofilizado

Se colocaron en sacos de acetato de celulosa 10 g del suero liofilizado disueltos en 30 ml de una solución de EDTA 0.05 M ajustada a pH 6.6 y se dializó contra 1 l de agua destilada conteniendo 10 ml de la solución de EDTA, con agitación, y cambiándola cada media hora cinco veces. La solución dializada se liofilizó nuevamente, pesando el residuo seco 4.5 g. A este sólido se le denominó *suero seco puro*.

INCUBACIONES

Determinación de la presencia y actividad de la 6-P-glucosa deshidrogenasa.

La presencia de esta enzima y su actividad*, se determinaron en un espectrofotómetro midiendo a 340 m μ y en distintos tiempos, el incremento de absorción provocado por la conversión NADP⁺ a NADPH. En la celdilla de la muestra se colocó una solución, que en el tiempo 0 (cuando se agrega NADP⁺) contenía 1 ml de sol. 0.2 M Tris, ajustada a pH 8 con HCl 0.2 M, 2 ml de Mg Cl₂ 0.3 M, 1.6 mg de suero seco puro, 2 mg de 6-P-glucosa y 0.04 ml de NADP⁺ (2 mg/ml) completado a 3 ml con agua destilada. La temperatura se mantuvo a 25°. En la celdilla del testigo se colocó la misma solución exceptuando el NADP⁺.

Los resultados de las lecturas se encuentran en la Fig. 1 en la que se comprueba que el suero seco puro contiene 6-P-glucosa deshidrogenasa y que la enzima está activa, ya que en otro experimento

*Ver nota en la pág. 22.

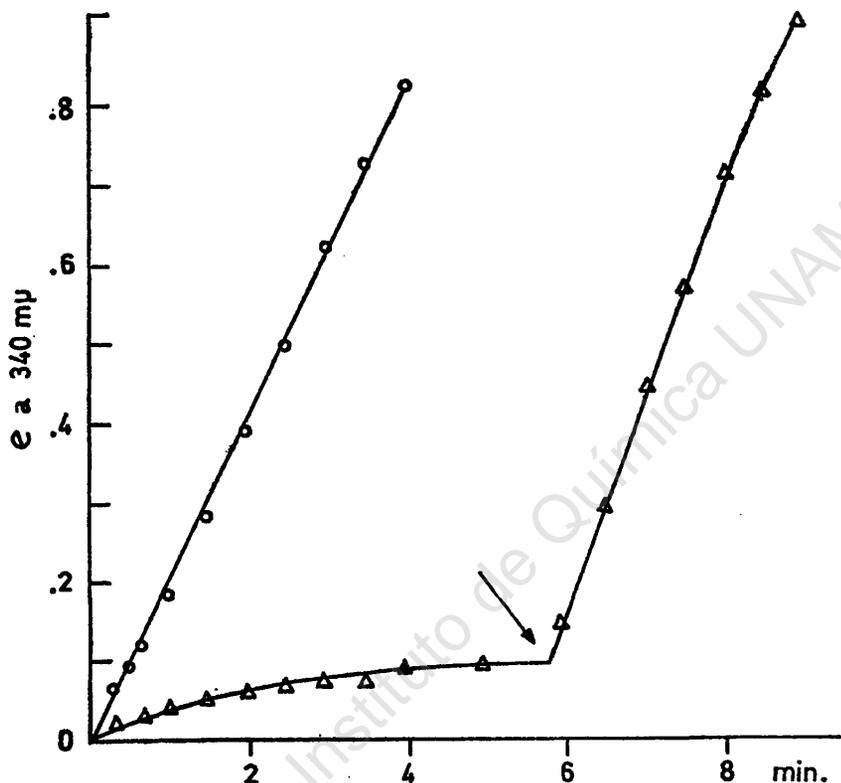


Fig. 1. Reducción del NADP⁺ a NADPH por el suero seco puro de *Hevea brasiliensis*.

O - Incubación completa.

Δ - Incubación omitiendo 6-P-glucosa. En el punto marcado con una flecha se añadió 6-P-glucosa.

en el que se omitió la 6-P-glucosa, la absorción a 340 mμ se mantuvo baja; al agregar 6-P-glucosa, rápidamente cambia la pendiente de la curva.

La actividad de la 6-P-glucosa deshidrogenasa se obtiene extrapolando a t_0 y calculando el aumento de extinción a 340 mμ durante el primer minuto. Después, con la fórmula

$$\Delta c = \frac{\Delta e}{6.22 \times 10^6}$$

Δc = incremento en la concentración de NADPH en el primer minuto por ml.

Δe = incremento en la extinción en el primer minuto.

$6.22 \times 10^3 = \epsilon$ de NADPH.

Actividad específica = $\frac{\Delta c}{\text{mg de proteína}}$ que corresponde a

13 μ moles de sustrato/min/mg de proteína.

Determinación de la presencia y actividad de la 6-P-glucónico deshidrogenasa.

La incubación se llevó a cabo en las mismas condiciones que

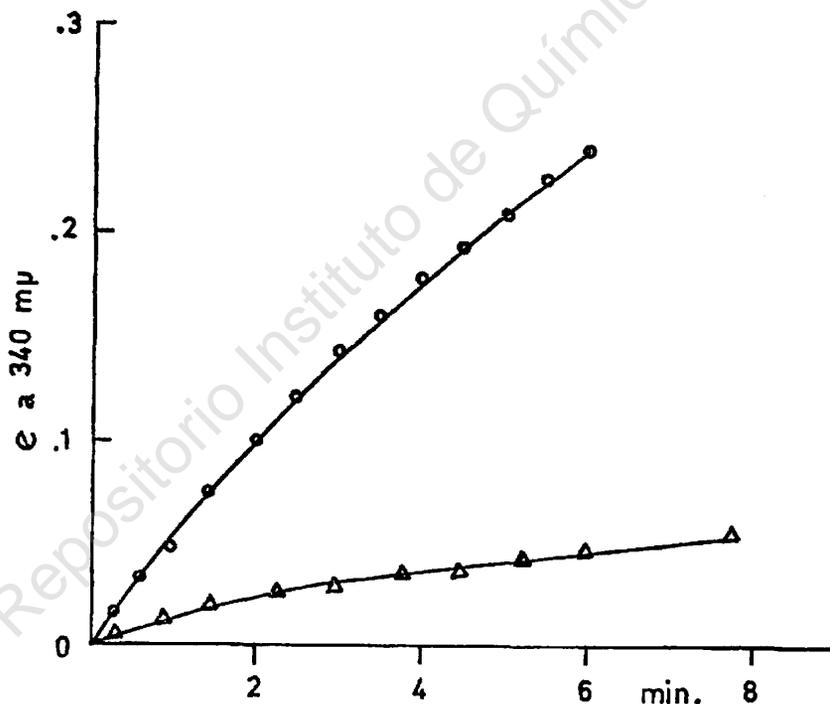


Fig. 2. Reducción del NADP⁺ a NADPH por el suero seco puro de *Hevea brasiliensis*.

O - En presencia de ácido 6-P-glucónico.

Δ - En ausencia de ácido 6-P-glucónico.

la descritas arriba, excepto que la cantidad de suero seco puro fue 3 mg y que en vez de 6-P-glucosa, se agregó 1 mg de ácido 6-P-glucónico. Como en el caso anterior, se midió la formación de NADPH a 340 m μ (Fig. 2). Se ve que al añadir ácido 6-P-glucónico la formación de NADPH aumentó en comparación al experimento en el que se omitió el sustrato, lo cual demuestra la existencia de la 6-P-glucónico deshidrogenasa en el látex. La actividad específica fue de 7.6 μ moles de sustrato/min/1 mg de proteína.

Estos dos resultados están de acuerdo con los dos pasos de oxidación en el ciclo de las pentosas.

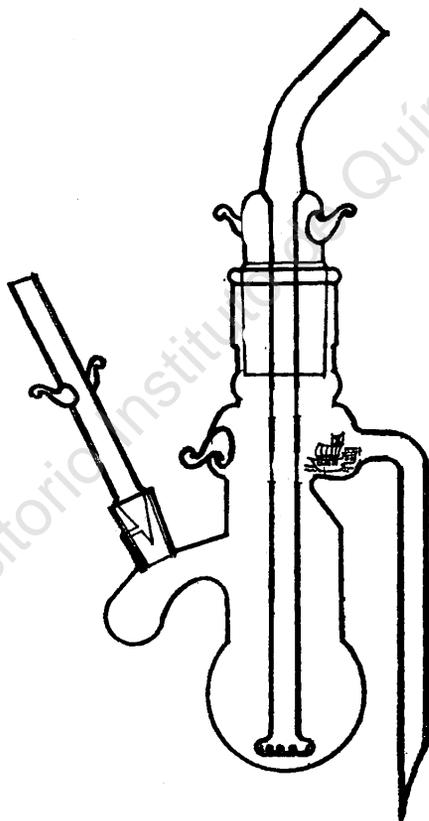


Fig. 3. Aparato para incubaciones con 6-P-¹⁴C glucosa.

Determinación de CO₂ proveniente de la 6-P-glucosa.

Para poder afirmar que el CO₂ desprendido provenía de la glucosa, se utilizó 6-P-¹⁴C glucosa en un aparato diseñado en este Instituto por el Dr. F. Walls (Fig. 3). La incubación se hizo con las mismas cantidades que las empleadas en la determinación de la 6-P-glucosa deshidrogenasa, con excepción del suero puro seco y de que en vez de agregar 2 mg de 6-P-glucosa, se agregó una alícuota de una solución de 6-P-¹⁴C glucosa, determinando el número de cuentas por minuto* en la mezcla que se coloca en el matraz. El suero puro seco (9.5 mg) se coloca en una navecilla de platino, o si se desea usar una solución del suero, se coloca en la rama lateral del matraz. El tubo lateral se sumerge en 2 ml de KOH al 20%. La reacción se inicia al hacer caer la navecilla a la solución. Se dejó a 25° durante 3.5 horas y luego se le pasó una corriente lenta de N₂. Después se volvió a contar la radiactividad en la solución de K₂¹⁴CO₃ así como la actividad residual. Se obtuvieron los siguientes resultados: cuenta inicial, 71 600; cuenta residual, 34 450; cuenta en el K₂¹⁴CO₃, 16 460. ¹⁴C recuperado como CO₂, 33%.

Este experimento demuestra nuevamente la presencia de la 6-P-glucosa deshidrogenasa y de la 6-P-glucónico deshidrogenasa bajo cuya acción el ácido 6-P-glucónico pierde CO₂.

Determinación de transcetolasa.

La determinación de esta enzima se basa en dos reacciones: la oxidación de NADH a NAD⁺ medida a 340 mμ, ocasionada por la P-dihidroxiacetona en presencia de 3-P-glicerol deshidrogenasa y 3-P-triosa isomerasa, y la reducción de NAD⁺ a NADH ocasionada por el 3-P-gliceraldehído en presencia de 3-P-gliceraldehído deshidrogenasa.

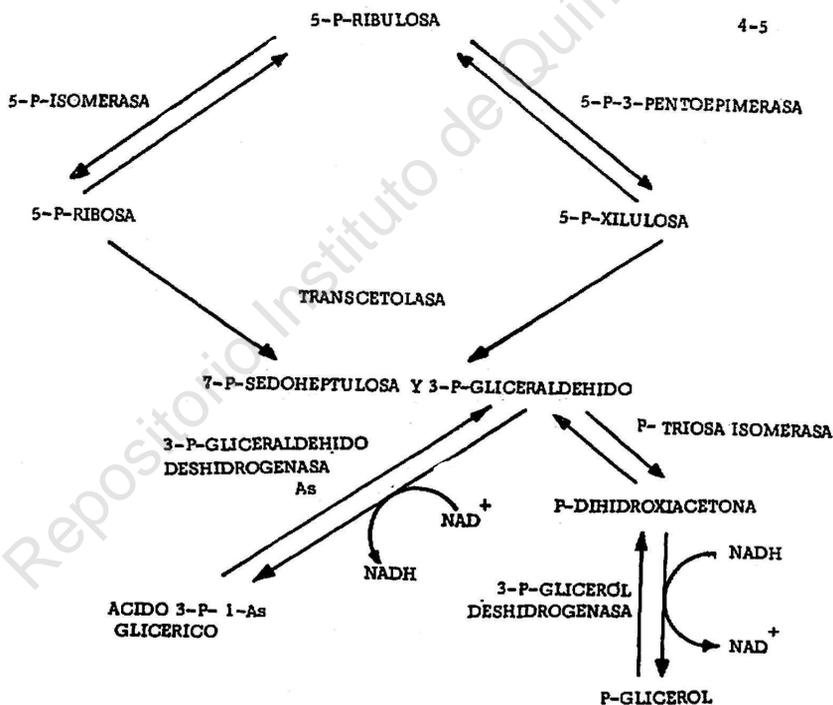
La incubación se lleva a cabo en dos etapas: en la primera se ponen 1 ml de pirofosfato de tiamina 0.2 mM, 1 ml de MgCl₂ 1 mM, 1 ml de arseniato de sodio 4.5 mM, 1 ml de solución Tris 0.2 M, 1 ml de 5-P-ribosa 1 mM y 10 mg de suero puro seco y se lleva el volumen a 6 ml. Se dejó durante 3 horas a 25°.

*Escalador 181-B Nuclear Chicago con tubo Geiger D-47 y gas Q.

La incubación se divide en 2 partes:

A 3 ml de la incubación se les agrega 0.6 mg de 3-P-glicerol deshidrogenasa y 3-P-triosa isomerasa (2 mg/ml) y 6 ml de agua destilada. De esta solución se colocan 3 ml en cada una de las dos celdillas del espectrofotómetro para ajustarlo a 100% de transmisión a 340 m μ . Después, a la celdilla de la solución se le agregan 0.6 mg de NADH. Midiendo a los 30 minutos la actividad en función de la disminución de la extinción a 340 m μ , se obtiene un valor de 114 μ moles de 3-P-gliceraldehido.

A los otros 3 ml de incubación se les agregó 0.3 ml de 3-P-gliceraldehido deshidrogenasa (10 mg/ml) y 6 ml de agua. En igual forma que en el caso anterior, se colocan 3 ml de sol. en cada una de las celdillas y una vez ajustado el aparato a 100% se le agrega a la celdilla de la solución 0.6 mg de NAD⁺. Se mide el aumento



Esquema II

de extinción a 340 μ debido a la formación de NADH, obteniéndose un valor de 160 μ moles de 3-P-gliceraldehído.

Estas dos determinaciones demuestran, por medio de un camino lateral, la formación de 7-P-sedoheptulosa y de 3-P-gliceraldehído, que forman parte, también, del ciclo de las pentosas (Esquema II).

Un valor aproximado de la actividad específica de la transcetolasa (en presencia solamente de 5-P-ribosa) se obtuvo al efectuar dos incubaciones a las que se les añadió las enzimas y coenzimas acopladas respectivas desde el tiempo cero, dando 1.34×10^{-3} y 1.80×10^{-3} μ moles de 3-P-gliceraldehído formado/min/ml/mg de proteína, respectivamente. Hay que hacer notar que estas actividades dependieron de la formación *in situ* de 5-P-xilulosa.

Demostración de la presencia de 6-P-isomerasa.

La incubación se llevó a cabo con 3 mg de 6-P-glucosa, 5 ml de solución Tris 0.2 M y 6.6 mg de suero seco puro, y se aforó a 10 ml. La formación de 6-P-fructosa se midió en el espectrofotómetro a 520 μ utilizando el método de Roe (5) que da una coloración al agregar resorcinol. Se encontró que se formaba 32% de 6-P-fructosa.

Demostración de la formación de 6-P-glucosa a partir de 5-P-ribosa.

Se efectuó la incubación con 5 mg de 5-P-ribosa, 0.8 mg de PP de tiamina, 1 ml de sol. Tris 0.2 M, 0.2 ml de $MgCl_2$ 0.3 M, 2 mg de $NADP^+$ y 1.3 de suero seco puro, llevando la solución a 3 ml. Se mide a 340 μ la formación de NADPH, utilizando en el testigo la misma solución con excepción de $NADP^+$. El resultado está en la Fig. 4, en la que el aumento de extinción a 340 μ , demuestra la formación de NADPH, que indica, a su vez, la formación de 6-P-glucosa.

Identificación de otros derivados del ciclo de las pentosas.

Se utilizaron tres métodos cromatográficos distintos, para analizar los P-azúcares u otros derivados de los azúcares.

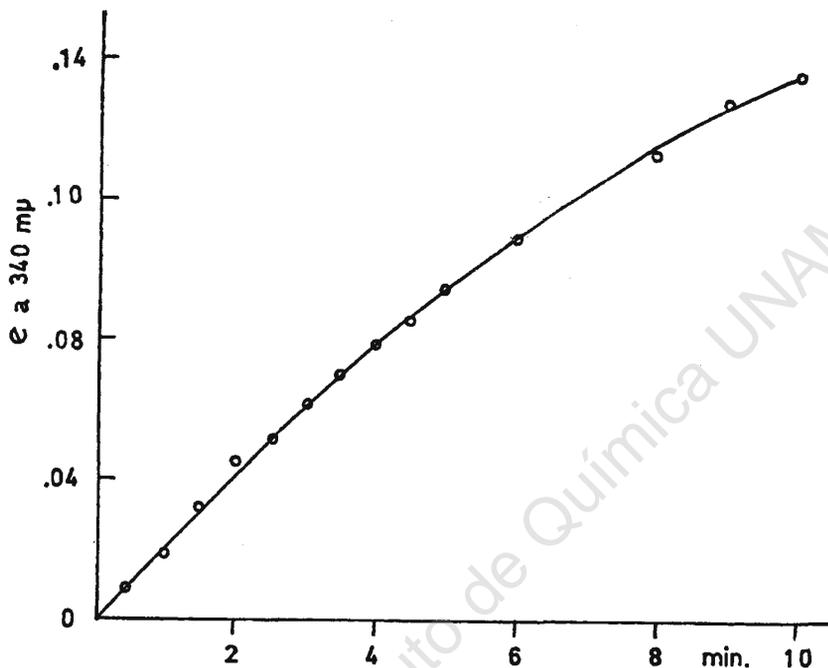


Fig. 4. Formación de NADPH al incubar suero seco puro de *Hevea brasiliensis* con 5-P-ribosa.

1) Cromatografía en columna con resinas cambiadoras de iones (Dowex 1 de 300 mallas lavada con formiato de sodio 2 M hasta que el eluato no da reacción de cloruros (6) y después se lavó con 50 ml de agua; Dowex de 20 a 50 mallas, lavada con HCl 0.1 N, agua hasta neutralidad y luego NaOH 0.1 N y finalmente agua hasta neutralidad, o Permutita Q, a la que primero se le pasa HCl 0.1 N y luego agua hasta neutralidad.

2) Cromatoplasas de 16 x 16 cm de Cellex.

3) Cromatografía en fase de vapor de los derivados de azúcares con trimetilsilano de acuerdo con técnicas descritas (7). Se utilizó una columna de 1.5 m y 1/8" de diámetro empacada con SE-30 (Wilkins) al 5% en Chromosorb W, en un aparato Varian Aero-graph 600 D con detector de flama a 160°. Flujo de helio, 25 ml/min; muestras de 0.1 μ l a 1.0 μ l.

Identificación de 5-P-ribosa, 5-P-ribulosa y 7-P-pseudoheptulosa.

Se incubaron 50 mg de 5-P-ribosa, 2 ml de $Mg Cl_2$ 0.3 M, 2 ml de arseniato de sodio 0.1 M, 2 ml de PP de tiamina 0.2 M, 40 mg de suero puro seco y 2 ml de sol. Tris 0.2 M, y se llevó el volumen a 12 ml. Se efectuó, al mismo tiempo, otra incubación en igual forma excepto que no contenía 5-P-ribosa.

Después de 5 horas a 25°, se calentó en baño de vapor para coagular la proteína que se eliminó por centrifugación.

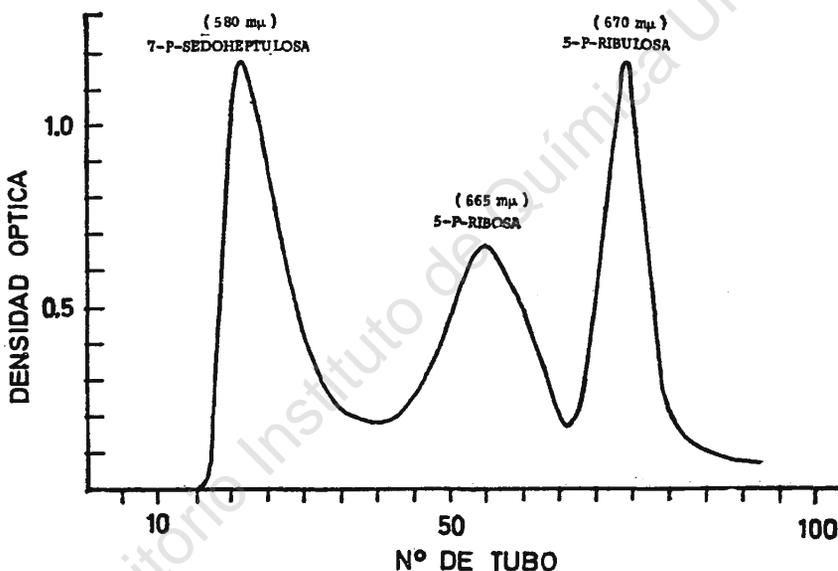


Fig. 5. Fosfatos de azúcares separados por cromatografía en columna e identificados espectrofotométricamente.

El líquido decantado se pasó por la columna de 2 x 20 cm con Dowex y se eluyó con ácido fórmico 2 N conteniendo 0.003 M de formiato de sodio, colectando fracciones de 2 ml en un colector automático Hösli tipo TT2. La identificación de los azúcares se llevó a cabo siguiendo la técnica de Horecker (6) haciendo reaccionar .02 ml de cada fracción con orcinol y midiendo el color desarrollado entre 480 y 700 mμ. Los resultados se encuentran en la Fig. 5 en

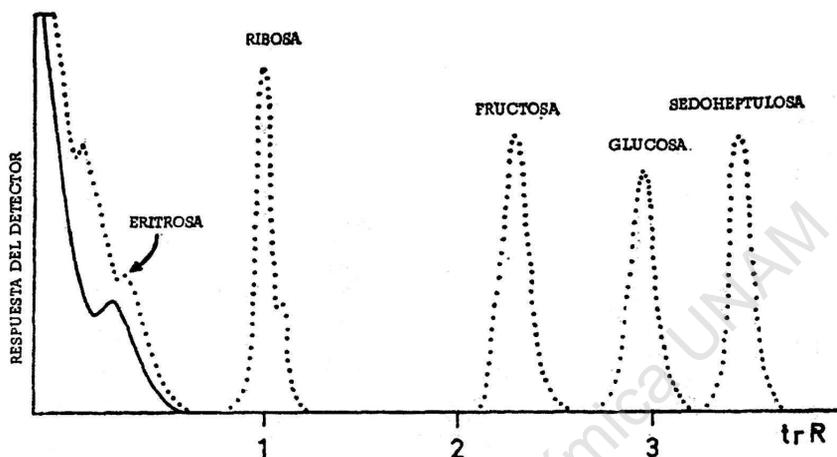


Fig. 6. Tiempo de retención relativa de éteres silícicos de azúcares disueltos en piridina, por medio de cfv. El primer pico corresponde a la piridina, que no se toma en consideración. El primer pico corresponde a una impureza de la eritrosa. La ribosa también muestra una impureza. En línea continua aparece el cromatograma correspondiente a la incubación de suero seco puro en ausencia de sustrato (5-P-ribosa y 6-P-glucosa) que demuestra que no contiene azúcares.

la que quedan identificadas 7-P- sedoheptulosa 5-P-ribosa y 5-P-ribulosa. En la incubación de control no se obtuvieron estos derivados de azúcares.

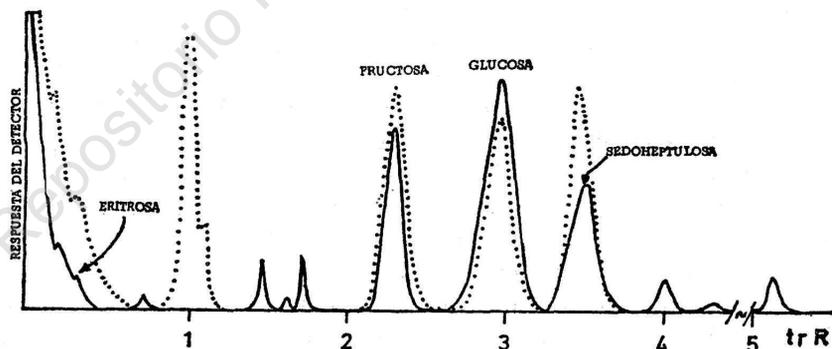


Fig. 7. Picos correspondientes a los azúcares obtenidos por incubación de suero seco puro con 5-P-ribosa; Azúcares tipo.

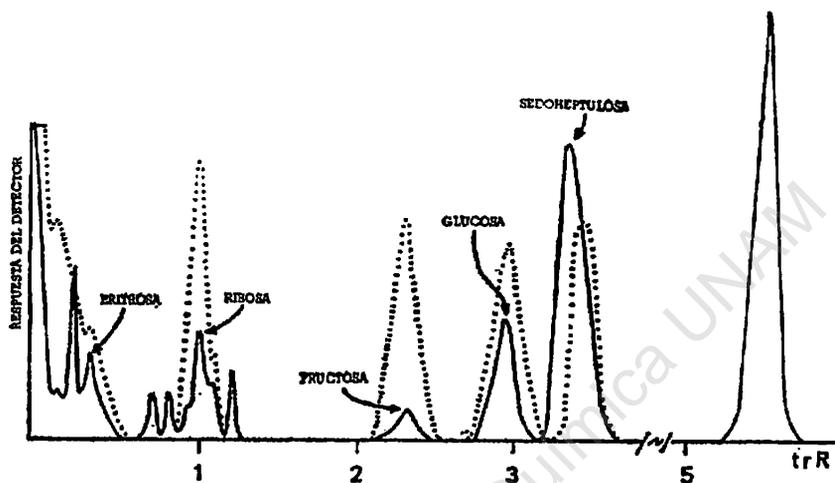


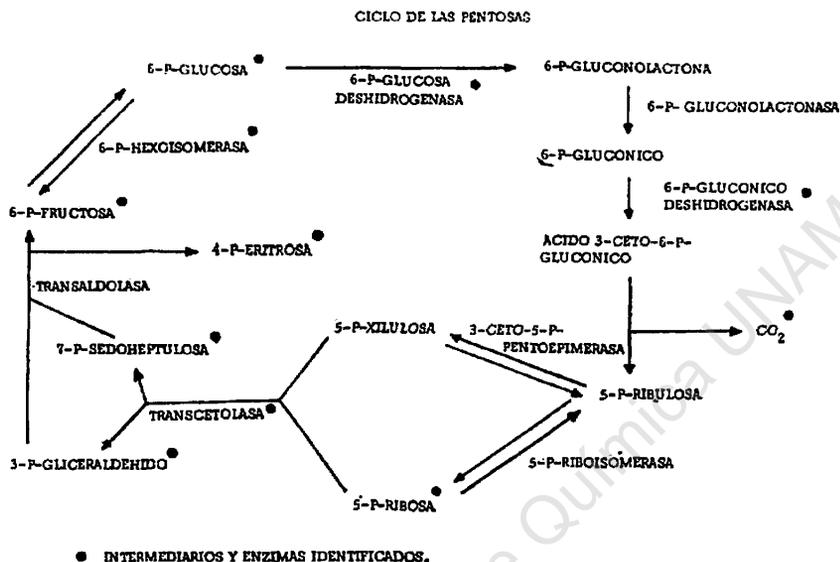
Fig. 8. Picos correspondientes a los azúcares obtenidos por incubación de suero seco puro con 6-P-glucosa; Azúcares tipo.

Se comprobó la identidad de los azúcares efectuando una incubación como se dijo anteriormente y después de eliminar la proteína y centrifugar, el líquido decantado se aciduló a pH 3-4 con HCl y se agregaron 30 mg de polidasa S. Se incubó 6 horas a 25°, se calentó al baño de vapor durante 15 min (para coagular la polidasa) y se centrifugó. El líquido decantado se pasó primero por permutita Q y después por Dowex 1, para eliminar fosfatos y cationes.

La solución de azúcares libres de iones se liofilizó. Una mínima parte del residuo seco se disolvió en agua destilada, y se cromatografió en placa Cellex D, eluyendo con una mezcla de 5 ml de dioxano conteniendo 1 ml de sol. acuosa de borato de potasio. Se reveló con orcinol y después con una solución de ácido oxálico-anilina. El primer revelador muestra la mancha correspondiente a sedoheptulosa y con el segundo, la ribosa.

El resto de los azúcares se disuelven en piridina anhidra (1 ml) y 0.2 ml de hexametildisilazano y 0.1 ml de trimetilclorosilano (7). Después de 30 minutos se centrifugó para separar un precipitado que se formó. La solución se inyectó en el cromatógrafo.

Para poder comparar los picos obtenidos, antes se efectuó la



misma operación con cada uno de los azúcares (con excepción de la ribulosa que no se consiguió) para determinar su t_R . También se efectuó una incubación en iguales condiciones excepto que se omitió la 5-P-ribosa. Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se debe hacer notar que los azúcares tienen algunas impurezas, como en la eritrosa y en la ribosa. La incubación en ausencia de sustratos (6-P-glucosa ó 5-P-ribosa) muestra un pico no identificado. No muestra ningún componente en donde se encuentren los azúcares tipo.

Al cromatografiar los azúcares obtenidos de la incubación con 5-P-ribosa, se obtiene el cromatograma que aparece en la Fig. 7. En distintas incubaciones se obtienen variaciones pequeñas, tanto en las alturas como en la presencia de picos no identificados. De este cromatograma se comprueba la formación de eritrosa, fructosa, glucosa y sedoheptulosa cuando se agrega, como sustrato, 5-P-ribosa.

En forma semejante se hizo una incubación en la que se agregó 6-P-glucosa. Los resultados se encuentran en la Fig. 8. En esta incubación se forman varios azúcares no identificados. Los porcentajes de los azúcares se encuentran en la Tabla I.

CONCLUSION

Se identificaron varias enzimas y P-azúcares que confirman que en el látex de *Hevea brasiliensis* opera el ciclo de las pentosas*, que probablemente está ligado a la biosíntesis del hule.

TABLA I

Porcentaje de azúcares y t,R respecto a la ribosa, obtenidos en incubaciones de suero seco puro de *Hevea brasiliensis*.

A.—Incubación con 5-P-ribosa (Fig. 7).			
Nº de pico		t,R	%
1	—————	0.19	0.8
2	Eritrosa	0.30	2.0
3	—————	0.71	1.0
4	—————	1.47	3.2
5	—————	1.63	1.6
6	—————	1.81	3.6
7	Fructosa	2.31	26.9
8	Glucosa	2.91	33.2
9	Sedoheptulosa	3.90	18.1
10	—————	4.02	4.0
11	—————	4.32	0.4
12	—————	5.2	5.32

B.—Incubación con 6-P-glucosa (Fig. 8).

1	—————	0.070	2.9
2	—————	0.196	10.7
3	Eritrosa	0.320	5.6
4	—————	0.700	3.0

*Uno de los árbitros de este trabajo hizo notar que en una reunión de la NRPPRA se había sugerido la presencia del ciclo de las pentosas en el látex íntegro de *Hevea brasiliensis* [F. J. Bealling en Proc. of the Natural Rubber Research Producers Association, pág. 113. Maclaren and Sons Ltd., London (1965)]. Sin embargo, se trata de comunicaciones personales, por lo que no apareceu en los Abstracts.

5	—————	0.820	3.1
6	—————	0.932	2.3
7	Ribosa	1.00	6.7
8	—————	1.10	3.5
9	—————	1.20	4.7
10	Fructosa	2.34	1.0
11	Glucosa	2.92	7.6
12	Sedoheptulosa	3.30	19.9
13	—————	5.55	28.6

ABSTRACT

Various enzymes of the pentose-phosphate shunt have been demonstrated to occur in the latex of *Hevea brasiliensis*. These observations are probably related to the mechanisms of biosynthesis of rubber. Full experimental details are provided.

BIBLIOGRAFIA

1. F. Lynen, *Pure and App. Chem.* **14**, 137 (1967).
2. H. G. Wood, *Physiol. Rev.* **35**, 481 (1955); B. L. Horecker y A. H. Mehler, *Ann. Rev. Biochem.* **24**, 207 (1955); F. Dickens, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **75**, 71 (1958); B. Axelrod, *Metabolic Pathways of Metabolism*, Vol. 1, 205. Academic Press Inc. N. Y. 1960.
3. G. Ashwell en *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Vol. 3, 450 (1957) Academic Press.
4. O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
5. G. Ashwell en *Methods in Enzymology*, S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Vol. 3, 75 (1957) Academic Press.
6. B. L. Horecker, P. Z. Smyrniotes y H. Klenow. *J. Biol. Chem.*, **203**, 661 (1953).
7. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita, W. W. Wells. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).