

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.

Estratto dal vol. XXVIII, serie 6^a, 2^o sem., fasc. 3-4 ferie. - Roma, agosto 1938-XVI

**Sulla composizione chimica delle proteine
muscolari della trota iridea in rapporto
alla maturazione sessuale.**

NOTA

DI

E. MARIOTTI



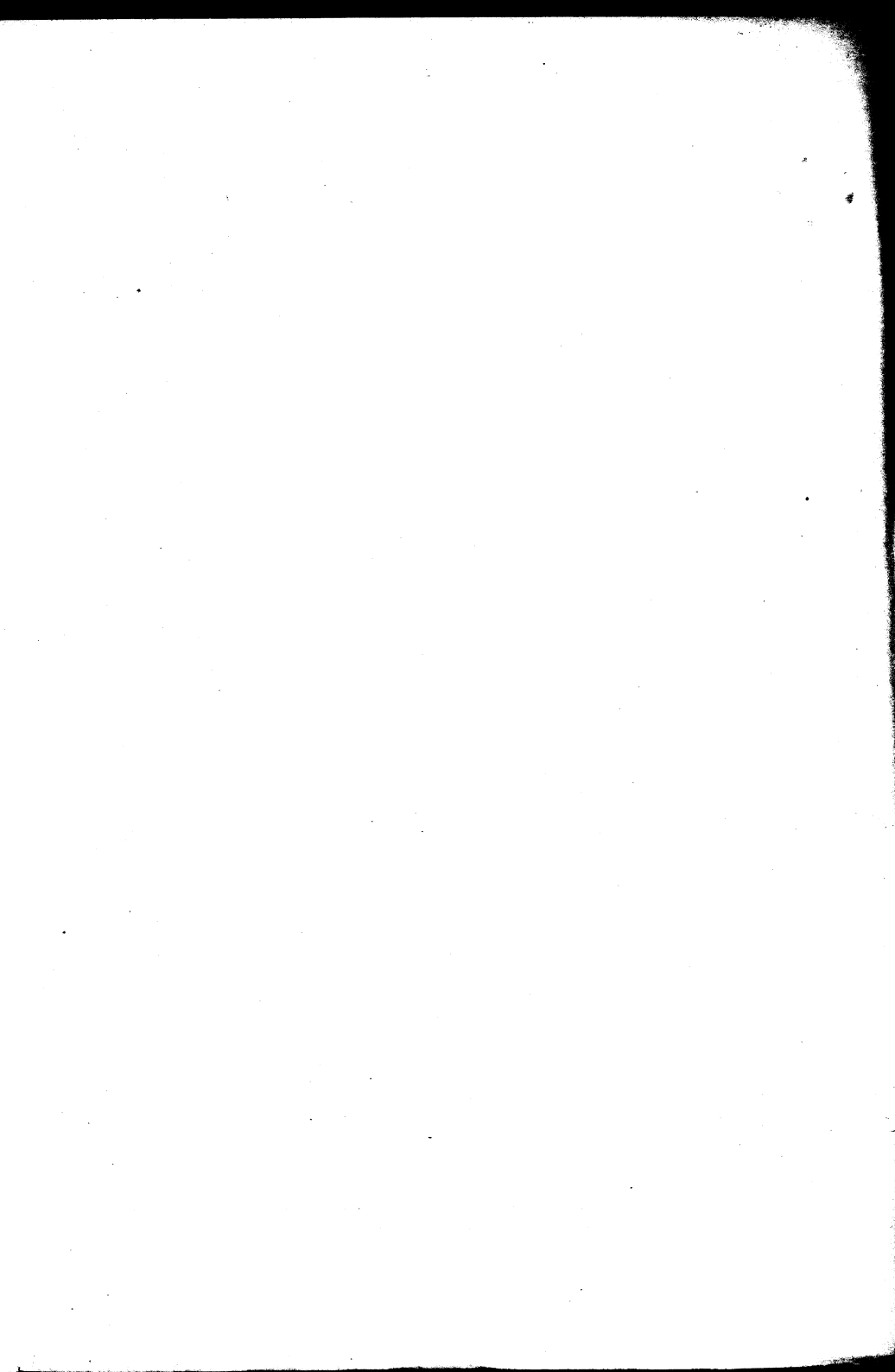
hik
JB
57
28

ROMA

DOTT. GIOVANNI BARDI

TIPOGrafo DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI

1938-XVI



Fisiologia. — *Sulla composizione chimica delle proteine muscolari della trota iridea in rapporto alla maturazione sessuale*⁽¹⁾.
Nota⁽²⁾ di E. MARIOTTI, presentata dal Corrisp. G. BRUNELLI.

La presente Nota riporta i dati ottenuti in alcune analisi eseguite sulle proteine muscolari di trota iridea secondo il metodo di Van Slyke, e le modificazioni di carattere tecnico apportate al metodo stesso usato nel lavoro.

Scopo delle ricerche era di investigare se esistano e quali siano le variazioni nella percentuale degli amminoacidi principali componenti le proteine del muscolo, in rapporto alla maturazione delle gonadi.

Infatti è opinione di molti fisiologi, come riportano anche N. Zuntz e A. Loewy⁽³⁾, che il ricambio materiale degli organi più importanti abbia la precedenza su quello degli altri, precedenza che si accentua quando, per diverse cause, venga ad essere limitato o insufficiente il materiale destinato al mantenimento dell'individuo. Non solo, ma in tali casi, sempre secondo la stessa teoria, si avrebbe una utilizzazione del materiale componente i tessuti di organi che hanno, o vengono ad avere minore importanza.

Questo fenomeno è stato riscontrato nei salmonidi, in cui si ha annualmente la costruzione di una quantità di prodotti sessuali che nella femmina può essere di più del venticinque per cento del peso totale, prodotti com-

(1) Lavoro eseguito nel R. Laboratorio centrale di Idrobiologia di Roma.

(2) Pervenuta all'Accademia il 27 luglio 1938.

(3) N. ZUNTZ e A. LOEWY, *Manuale di Fisiologia dell'Uomo*, Un. Tip. Ed. Torinese, Torino, 1921, p. 721.

posti da materiale di primissimo ordine, come attestano le analisi di numerosi autori.

Il salmone del Reno, durante il periodo della maturazione, compie il suo viaggio dal mare verso i fiumi per riprodurvi, e non assume nutrimento dall'esterno cosicchè la costruzione delle uova e delle cellule seminali avviene a spese del grasso sottocutaneo, per quello che concerne i grassi, e della massa dei muscoli, per quello che concerne le proteine.

Infatti durante le mie esperienze ho notato che, se si divide il numero indicante il peso della muscolatura totale di una trota, per quello indicante il peso delle gonadi, si ottiene un numero, che si potrebbe chiamare *modulo di maturazione*, che va rapidamente diminuendo col crescere del grado di maturazione dell'individuo.

Tale diminuzione può attestare una precedenza del ricambio concernente la fabbricazione dei prodotti sessuali, sul ricambio attivo dei tessuti muscolari. Inoltre le proteine delle uova e dello sperma sono proteine di composizione chimica diversa da quelle muscolari, e di un valore molto diverso per il loro contenuto percentuale superiore in amminoacidi indispensabili e in composti fosforati, cosicchè il nutrimento normale può non essere sufficiente a sopperire a tutte le esigenze occasionali di questi nuovi tessuti.

È parso così utile indagare se, in trote iridee di ambo i sessi, allevate in acquario, in eguali condizioni di nutrimento, di età, e alla stessa distanza di tempo dall'ultima spremitura, si avessero variazioni nella composizione chimica delle proteine muscolari, in un periodo complessivo di sette mesi, di cui cinque prima della spremitura e due dopo, di cui uno, il secondo, in istato di completa inanizione.

Abbiamo allo scopo adottato il metodo di Van Slyke per l'analisi delle proteine⁽¹⁾. Questo consta come è noto delle parti seguenti: Idrolisi delle proteine con acido cloridrico; nell'idrolisato, dopo allontanato l'acido cloridrico, determinazione delle melanine e dell'azoto ammidico; precipitazione con acido fosfowolframico in ambiente acido degli amminoacidi contenenti due gruppi amminici, arginina, istidina lisina e cistina, determinazione diretta dell'arginina e della cistina precipitata e valutazione indiretta degli altri due.

Il modo di esecuzione delle singole operazioni è di capitale importanza per l'ottenimento di risultati concordanti e che diano affidamento.

Siccome la quantità di azoto presente nell'idrolisato influisce, come vedremo, sui valori che si ottengono nella frazione dei fosfowolframati^{(2) (3)},

(1) VAN SLYKE, « J. Biol. Chem. », 10, 1911, pp. 15-55; 22, 1915, p. 281; 23, 1915, p. 411.

(2) KERNOTT J. C., JONN KNAGGS e N. E. SPEER, « Biochem. J. », 24 (2), 1930, p. 379.

(3) THIMANN, K. V., « Biochem. J. », 24, 1930, pp. 368-377.

così occorre eseguire la determinazione sempre sulla stessa quantità di sostanza e su volumi rispettivamente sempre uguali di soluzioni.

Il tipo di acido con cui si eseguisce l'idrolisi, la concentrazione dell'acido stesso, e la durata dell'ebollizione, influiscono sui risultati. Kossel e Kutscher ⁽¹⁾ trovano sperimentando con H_2SO_4 per 12 ore (a), HCl concentrato per 12 ore (b), e HCl diluito per tre ore (c), le seguenti differenze.

	a	b	c
Istidina	0.90	0.76	1.56
Arginina	4.15	4.21	4.50
Lisina	1.84	2.29	2.00

Pare che anche un prolungato contatto a freddo tra la proteina e l'idrolisante, prima dell'inizio dell'ebollizione influisca sui risultati ⁽²⁾.

L'allontanamento dell'azoto ammoniacale e la separazione delle melanine è un'operazione molto delicata in quanto occorre portare in ambiente alcalino l'idrolisato e distillarne l' NH_3 . Ora tra gli aminoacidi presenti ve ne sono alcuni, la cistina e l'arginina, che in ambiente anche debolmente alcalino si decompongono ⁽³⁾.

È stata studiata una modificazione per ovviare alla decomposizione dell'arginina, allontanare l'N ammidico, e decomporre al tempo stesso la cistina presente, in modo da dosarne lo zolfo eliminandola prima della precipitazione dei fosfotungstati ⁽⁴⁾. Nel nostro caso però la quantità di cistina era trascurabile, e non ci siamo dovuti occupare di questo problema.

Gran parte degli autori eseguono la separazione dell' NH_3 mediante distillazione a pressione ridotta. Plimmer e Rosedale ⁽⁵⁾ trovano che durante l'evaporazione della soluzione alcalinizzata con CaO , si hanno perdite di NH_3 ed usano il metodo dell'aereazione per scacciare l'ammoniaca dalla soluzione e dosarla, metodo che ho adottato io pure nel presente lavoro.

L'operazione più importante nel metodo di Van Slyke è la precipitazione dei fosfowolframati delle basi. Gran parte delle discrepanze tra i valori trovati dai diversi ricercatori sullo stesso argomento, è dovuto, secondo Kernott e Knaggs ⁽²⁾, al variare di numerose condizioni da cui dipende

(1) KOSSEL e KUTSCHER, «Z. Physiol. Chem.», XXXI, 1900, p. 165.

(2) KERNOTT e KNAGGS, «Biochem. J.», 22, 1928, p. 528.

(3) HOFMANN, «J. Biol. Chem.», 67, 1925, p. 251; DENIS, «J. Biol. Chem.», 8, p. 365.

(4) E. MARIOTTI, «Rend. della R. Acc. dei Lincei», vol. XXVI, ser. 6^a, 2^o sem., fasc. 7-8, ottobre 1937.

(5) R. H. A. PLIMMER e J. L. ROSEDALE, «Biochem. J.», 19, 1925, p. 1001, XXX, p. 1021.

la percentuale di azoto precipitata dall'acido fosfotungstico. Tali condizioni sono:

1° La concentrazione dell'azoto nella soluzione, che ⁽¹⁾ influisce sulla precipitazione per formazione di complessi ⁽²⁾ tra le basi e alcuni monoamminoacidi, complessi che non precipitano con acido fosfowolframico.

2° La temperatura a cui avviene la precipitazione e il sedimentare del precipitato. Infatti i fosfotungstati sono parzialmente solubili ⁽³⁾, solubilità che varia col variare della temperatura.

3° Il PH della soluzione.

Un eccesso del precipitante non influisce sui risultati ⁽⁴⁾, mentre come è intuitivo, ha grande importanza il lavaggio del precipitato. La prolina può precipitare con i tre aminoacidi suddetti, per circa il 35 % ⁽⁵⁾.

Data questa importanza delle varianti nei particolari della tecnica, riporto qui dettagliatamente solo le modificazioni apportate al metodo di Van Slyke per quel che riguarda la precipitazione e il trattamento delle basi. Per maggiori particolari si rimanda al lavoro in corso di stampa.

Si portano cc. 20 della soluzione liberata dalle melanine e dall' NH_3 , e contenente gr. 3 di sostanza (calcolata libera da ceneri) in 150 cc., in un tubo da centrifuga da 50 cc. nel quale si sia fatto un segno alla capacità di cc. 30. Vengono neutralizzati con NaOH diluito, indi addizionati di cc. 4 di HCl 37 % e portati con acqua al volume di cc. 30.

La soluzione ha così il PH optimum per la precipitazione e le condizioni vengono riprodotte identicamente per ogni analisi.

Si lascia raffreddare, si aggiunge un leggero eccesso di acido fosfowolframico al 30 %, si agita e si centrifuga. Si aspira la soluzione sovrastante con un capillare applicato alla pompa e si lava tre volte con HCl al 5 % (15 cc. ogni volta) centrifugando.

Il precipitato viene quindi disciolto in NaOH al 10 % fino a leggera alcalinità (fenolfaleina), e addizionato di un lieve eccesso di BaCl_2 . Si centrifuga trasportando il liquido limpido sovrastante in una beutina a cui è applicato un capillare, e in cui si opera una depressione.

In tal modo si raggiunge lo scopo di operare la precipitazione in un mezzo avente sempre la stessa acidità, e sempre la stessa concentrazione di azoto all'incirca. Inoltre l'operazione è molto rapida, e il lavaggio per centrifugazione consente una separazione perfetta del precipitato e un controllo rigoroso delle condizioni di lavaggio.

(1) Ved. Nota citata in (2), p. 62.

(2) N. J. GAWRILOW e M. M. BOTWINIK, « Biochem. Zeitschr. », 214, (1/3), 1929, p. 119.

(3) Ved. Nota citata in (3), p. 62.

(4) Ved. Nota citata in (5), p. 63.

Ripetendo più volte la precipitazione sulla stessa soluzione si trova che le differenze oscillano intorno all'1-2 %:

	I	II	III
Arginina	13.50	13.50	13.48
Istidina	3.92	3.93	3.92
Lisina	19.41	19.41	19.41

Il liquido contenente le basi viene concentrato dopo acidificazione, e portato a volume di 50 cc. (Soluzione B) su cui si determina arginina, N-amminico, e N totale. L'istidina viene calcolata con la formula Van Slyke:

$$H = 3/2 (D - 3/4 \text{ arg.})$$

dove H = istidina e D = N non amminico dei diamminoacidi.

L'N amminico residuo e l'N non amminico residuo, vengono calcolati per differenza.

I risultati ottenuti sono esposti nelle tabelle e nei grafici seguenti:

TABELLA I.

Numero	Data	Età anni	Sesso	Peso muscolo	Peso gonadi	Rapp. M/G	N Uminico *	N Ammidico *	N di Arginina *	N di Istidina *	N di Lisina *	N complessivo delle basi *	N amminico residuo *	N non amm. resid. *	N Totale %
1	10-10	1	?	—	—	—	1.14	8.60	13.50	3.92	19.41	36.83	48.07	5.36	15.81
2	29-9	4	M	179.00	7.80	22.95	1.75	7.52	10.81	7.77	15.41	33.99	49.96	6.75	16.55
3	18-10	4	M	82.00	5.44	15.06	1.73	8.39	11.22	7.99	15.18	34.39	49.13	6.36	16.17
4	12-11	4	M	70.00	6.45	10.84	1.87	7.38	11.06	7.70	16.20	34.96	51.48	4.41	15.61
5	3-12	4	M	80.70	9.17	8.80	1.78	7.52	11.24	7.44	16.40	35.08	51.24	4.38	15.78
6	8-1	4	M	56.60	7.60	7.45	1.77	7.60	11.77	7.25	16.46	35.48	50.94	4.21	15.80
7	3-2	4	M	156.00	22.35	6.98	1.68	7.58	12.40	6.08	16.88	35.36	53.30	2.08	15.90
8	4-3	4	M	—	—	—	1.72	7.76	12.88	5.98	14.04	32.90	53.28	4.34	15.68
9	3-5	4	M	—	—	—	2.23	8.88	17.00	2.30	11.51	30.81	54.48	3.60	15.64

* Per N tot. = 100.

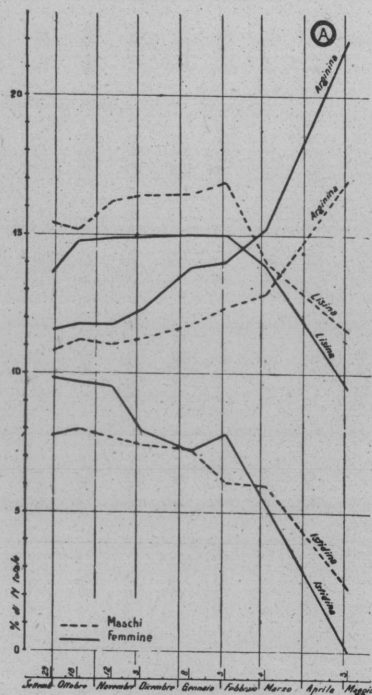
TABELLA II.

Numero	Data	Età anni	Sesso	Peso muscolo	Peso gonadi	Rapp. M/G	N Uminico *	N Ammidico *	N di Argantina *	N di Istidina *	N di Lisina *	N complessivo delle basi *	N amminico residuo *	N non amm. resid. *	N Totale o/o
1	10-10	1	?	—	—	—	1.14	8.60	13.50	3.92	19.41	36.83	48.07	5.36	15.81
10	29-9	4	F	81.55	5.04	16.18	1.39	7.68	11.55	9.85	13.57	35.97	46.05	12.94	15.33
11	18-10	4	F	100.12	8.78	11.40	1.68	7.76	11.77	9.70	14.75	36.22	45.02	9.32	15.46
12	12-11	4	F	184.00	20.50	8.98	1.52	7.76	11.76	9.53	14.88	36.17	47.68	6.88	15.98
13	3-12	4	F	181.00	32.00	5.65	1.60	7.61	12.30	7.96	14.90	35.16	47.41	6.70	15.13
14	8-1	4	F	72.53	45.10	1.61	1.84	5.86	13.83	7.24	15.00	36.07	52.20	4.03	15.18
15	3-2	4	F	116.00	72.50	1.60	1.32	7.84	14.03	7.82	15.01	36.86	50.08	1.90	15.96
16	4-3	4	F	—	—	—	1.57	7.59	15.22	5.26	13.88	34.36	51.05	5.43	15.38
17	3-2	4	F	64.25	70.00	0.91	1.26	8.22	18.18	8.90	7.54	34.72	55.29	0.62	16.17
18	3-5	4	F	—	—	—	1.87	8.37	22.04	0.00	9.44	31.48	53.28	5.00	15.88

* Per N tot. = 100.

La determinazione n. 1 che si trova riportata in ambedue le tabelle come confronto, è stata operata sul tessuto muscolare di tre trotelle di età un poco inferiore a un anno, il cui sesso non era praticamente definibile.

Le determinazioni che vanno dal n. 2 al n. 8 (maschi), e dal n. 10 al n. 16 (femmine), sono state eseguite su coppie di animali adulti di età oscillante intorno ai quattro anni, pescati, come indicano le tabelle, in date che distano tra loro circa un mese. Tali date sono riportate in ascisse nel grafico A, nel quale grafico non compaiono i valori che si riferiscono alla determinazione n. 17.

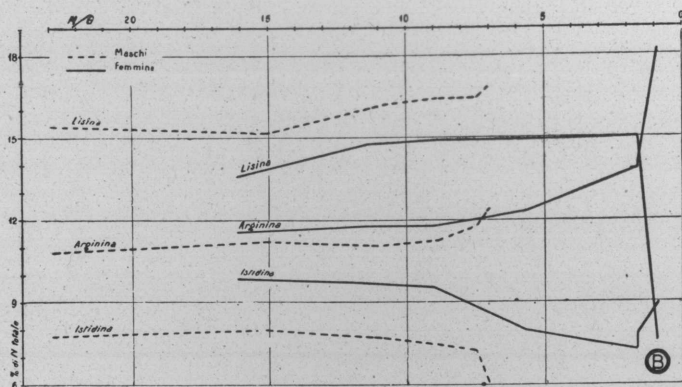


La data del 3 febbraio corrisponde alla spremitura, e quindi alla completa maturazione, per gli individui corrispondenti alle determinazioni n. 7 e n. 15.

La determinazione n. 17 si riferisce a un caso particolarmente notevole. Si tratta di una trota adulta di sesso femminile, che l'anno precedente non aveva subito la spremitura, cosicchè conteneva nelle gonadi, le uova dell'anno precedente schiacciate e in parte riassorbite, oltre a quelle formate durante l'ultimo periodo di maturazione. Il peso totale era di gr. 250, e il rapporto Muscolo totale/gonadi era inferiore a uno.

Infine le determinazioni n. 9 e n. 18 si riferiscono a una coppia di trote spremute in data 3 febbraio e mantenute in istato di completa inazione durante tutto il secondo mese dopo la spremitura.

Il grafico B riporta le variazioni della arginina, istidina, lisina, rispetto al modulo di maturazione M/G da me ricavato, e contiene solo i dati riferentisi alle determinazioni dal n. 2 al n. 7 (maschi), e dal n. 10 al n. 17 (femmine), e cioè solo fino all'epoca della spremitura; l'ultimo tratto della curva corrisponde al n. 17.



Le tabelle e i grafici riportati dimostrano come, durante il periodo della maturazione, si abbia nelle proteine muscolari della trota iridea un aumento della percentuale dell'azoto di arginina, e una diminuzione nella istidina e nella lisina, la prima in modo molto più marcato.

Tali variazioni sono tanto più evidenti, quanto più si avvicina l'epoca della maturazione completa; si accentuano nel periodo di abbattimento e di inedia quasi completa che segue immediatamente la spremitura, e divengono notevolissime prolungando di proposito lo stato di inanizione.

Tutto ciò si verifica in modo molto meno evidente nel maschio che nella femmina, nella quale si ottiene il valore zero per l'istidina nel secondo mese di inedia dopo la spremitura (tab. II, n. 18).

Per l'interpretazione dei valori qui riportati rimandiamo al lavoro per esteso in via di compilazione.

54686



~~325691~~

