

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

VINCENZO ZAPPIA, CLOTILDE COSTA, FRANCESCO  
SALVATORE

## Deaminazione degli aminoacidi naturali in organi di pesci elasmobranchi e teleostei

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.4, p. 540–544.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_38\\_4\\_540\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_4_540_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di  
ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le  
copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Biochimica.** — *Deaminazione degli aminoacidi naturali in organi di pesci elasmobranchi e teleostei*<sup>(\*)</sup>. Nota di VINCENZO ZAPPIA, CLOTTILDE COSTA<sup>(\*\*)</sup> e FRANCESCO SALVATORE, presentata<sup>(\*\*\*)</sup> dal Corrisp. F. CEDRANGOLO.

I pesci teleostei e quelli elasmobranchi presentano un differente tipo di metabolismo azotato, prevalentemente ammoniotelico gli uni, ureotelico gli altri [1, 2]. La grande quantità di urea presente in pressoché tutti gli organi degli elasmobranchi (fino al 2-2,5%), nel sangue, nonché negli escreti di detti animali, contribuisce d'altra parte al mantenimento della isotonicità dei liquidi biologici dell'animale con l'acqua di mare [1, 2].

Passando a considerare gli enzimi connessi al catabolismo dell'azoto proteico, risulta dalla Letteratura che negli organi degli elasmobranchi sono presenti gli enzimi correlati al ciclo della biosintesi dell'urea (ornitina-transcarbamilasi, argininosuccinato-sintetasi, argininosuccinato-liasi e arginasi) ad eccezione della carbamilmfosfato-sintetasi [1, 3]. Negli organi dei teleostei, al contrario, detti enzimi sono risultati assenti, eccetto l'arginasi che è stata riscontrata in alcuni casi [1].

Nonostante tali diversità nel catabolismo proteico azotato, sia dal punto di vista dell'escrezione dei cataboliti terminali, sia da quello degli enzimi correlati alla biosintesi dell'urea, non era mai stato preso in considerazione nei tessuti dei pesci il processo di distacco del gruppo aminico degli aminoacidi.

Pertanto, abbiamo intrapreso uno studio sistematico sulla deaminazione degli aminoacidi naturali in differenti organi di pesci appartenenti alle due summenzionate classi.

#### MATERIALI E METODI.

La glicina ed altri 19 aminoacidi della serie L, adoperati nelle presenti ricerche, erano prodotti puri della B.D.H., Nutr. Biochem. Co., Hoffmann-La Roche e Merck.

La presenza del solo L-isomero era controllata saggiando le soluzioni di aminoacidi con D-aminoacidossidasi purificata da rene di maiale (Sigma). Preparazioni contenenti anche minime impurità del D-isomero venivano scartate: per tale ragione non è stato possibile impiegare fenilalanina nei nostri esperimenti.

(\*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Napoli con l'ausilio di contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Impresa Enzimologia) e presso la Stazione Zoologica di Napoli.

(\*\*) Borsista C.N.R. presso la Stazione Zoologica di Napoli.

(\*\*\*) Nella seduta del 10 aprile 1965.

Il reattivo di Nessler era preparato secondo Vanselow [4]; il puffer di borato secondo Reinhold e Chung [5].

L'attività di deaminazione degli aminoacidi è stata seguita sulla base della ammoniaca prodotta. Il consumo di ossigeno è stato infatti ritenuto un indice non riferibile esclusivamente alla deaminazione degli aminoacidi (ossidazione del chetoacido formato dopo il distacco del gruppo aminico, esistenza di processi deaminativi non ossidativi). D'altra parte, in prove preliminari, è stata verificata la non rispondenza tra i valori di consumo di ossigeno (determinato all'apparecchio di Warburg) e l'ammoniaca extra-formata (differenza tra ammoniaca prodotta nella prova con substrato ed ammoniaca prodotta nella prova senza aggiunta di substrato).

L'ammoniaca veniva dosata con la tecnica della microdiffusione secondo Seligson e Hirahara [6]. Il pH durante la microdiffusione era mantenuto costante ( $\text{pH} = 11 \pm 0,2$ ) ad opera del puffer di borato. Una completa microdiffusione dell'ammoniaca avveniva in 90 min.

#### PROCEDURA.

Gli animali adoperati erano due specie di Teleostei (*Mugil Cephalus*, *Gobius niger jozo*) ed una specie tra gli Elasmobranchi (*Scyllium canicula*), tutti del Mar Mediterraneo. Il fegato, il rene ed il cervello erano prelevati da animali viventi, subito dilavati con puffer di fosfati ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ — $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M,  $\text{pH} = 7,4$ ) e asciugati su carta da filtro. Si allontanava l'eccesso di grasso e di tessuto connettivo e si procedeva ad omogenizzazione in *potter* di vetro a 1000 r.p.m. per 2 min (omogenato al 30 %, v/v, in puffer di fosfati). Le operazioni venivano effettuate tutte a 0°C.

Le miscele di incubazione, allestite secondo le modalità indicate nella fig. 1, venivano incubate a 37°C in bagno termostato ad agitazione meccanica.

Per ogni esperimento venivano sempre condotte prove in bianco senza enzima o con enzima inattivato al tempo 0. La presenza di arsenito sodico [7,8] e l'assenza di ATP e di NAD(P)H (che favoriscono l'organicizzazione dell' $\text{NH}_3$ [9]) risultavano le condizioni più atte ad evidenziare il processo deaminativo sulla base dell'ammoniaca extra-formata.

Alla fine dell'incubazione 1 ml della miscela veniva direttamente posto in bottigline di microdiffusione contenenti 2 ml di puffer di borato. L'ammoniaca raccolta su  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N veniva dosata colorimetricamente ( $\lambda = 420 \text{ m}\mu$ ), dopo reazione con il reattivo di Nessler (10 ml di reattivo diluito 1 : 10).

#### RISULTATI <sup>(1)</sup> E DISCUSSIONE.

Nella fig. 1 vengono riportati i risultati relativi alla deaminazione dell'acido L-aspartico e della L-istidina, che sono risultati i due aminoacidi deaminati con maggiore velocità e più diffusamente.

(1) Risultati preliminari sono stati presentati al VI Congresso Internazionale di Chimica Biologica, New York 1964 [10].

TABELLA.  
*Produzione di ammoniaca da alcuni L-aminoacidi (\*) in tessuti di pesci elasmobranchi e teleostei.*

Per le modalità sperimentali vedi fig. 1.

I singoli aminoacidi sono sempre stati aggiunti in concentrazione  $4,3 \times 10^{-2}$  M. I valori sono espressi in  $\mu\text{g NH}_3$  extraformati per h nella miscela di incubazione (differenza tra  $\text{NH}_3$  formata in presenza di aminoacido e  $\text{NH}_3$  in assenza di aminoacido); tali valori seguiti dal dato dell'errore probabile rappresentano la media di 7-10 esperimenti.

<i>Scyllium canicula</i>			<i>Mugil Cephalus</i>			<i>Gobius niger jozo</i>		
Fegato	Rene	Cervello	Fegato	Rene	Cervello	Fegato	Rene	
Cisteina $+28,5 \pm 6,3$	Cistina $+35,7 \pm 4,8$	Cisteina $+24,0 \pm 9,9$	Cistina $+21,0 \pm 2,1$	Cistina $+23,4 \pm 8,1$	Glicina $+11,4 \pm 0,9$	Citrullina $+16,5 \pm 1,5$		Triptofano $+25,2 \pm 9,6$
Cistina $+16,5 \pm 2,4$	Ac. Glutammico $+27,3 \pm 5,4$	Glicina $+22,2 \pm 0,6$	Leucina $+14,4 \pm 1,2$	Ornitina $+13,2 \pm 1,2$		Cistina $+14,1 \pm 5,7$	Lisina $+14,1 \pm 3,3$	
Ornitina $+9,3 \pm 0,9$	Serina $+13,5 \pm 0,6$	Ornitina $+18,9 \pm 0,3$	Ornitina $+14,4 \pm 0,6$	Lisina $+10,2 \pm 0,6$		Cisteina $+10,5 \pm 0,6$	Cisteina $+9,6 \pm 1,8$	
	Ornitina $+10,8 \pm 1,2$	Lisina $+9,9 \pm 2,1$	Citrullina $+10,8 \pm 1,8$					
			Lisina $+10,2 \pm 1,8$					

(\*) Per i singoli tessuti sono riportati solo gli aminoacidi che hanno mostrato un valore significativo di deaminazione (ad eccezione dell'acido aspartico e dell'istidina per cui vedi fig. 1).

I dati riportati nella fig. 1 sono di particolare interesse, in quanto indicano l'eventuale presenza di un'attività aspartasica, mai precedentemente trovata in alcun tessuto animale. Tale attività, infatti, era stata evidenziata in precedenza soltanto in tessuti vegetali e in microorganismi [11]. Sono in corso ricerche sulla caratterizzazione e purificazione di questa attività enzimatica.

La deaminazione dell'istidina nel rene dei Teleostei, come risulta dalla fig. 1, è anche un dato che va ulteriormente approfondito, in quanto l'attività istidasica [11, 12] era stata finora riscontrata solo nel fegato.

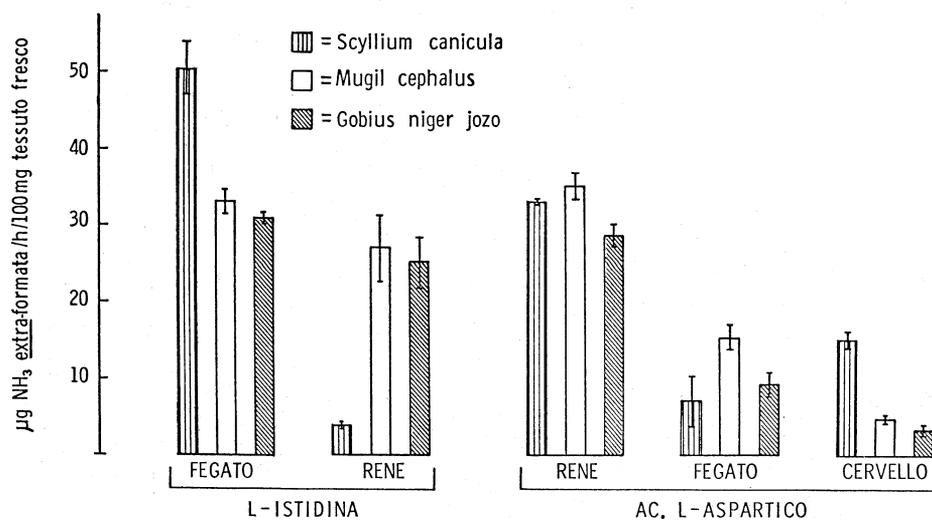


Fig. 1. — Deaminazione dell'acido L-aspartico e della L-istidina in organi di pesci elasmobranchi e teleostei.

Omogenato al 30 % v/v in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ — $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 M, pH 7,4 : 1 ml; arsenito sodico ed  $\text{MgCl}_2$  : 10  $\mu$ -mol ciascuno; L-aminoacido: 129  $\mu$ -mol; volume finale 3 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  bidistillata; incubazione a 37°C per 1 h in ambiente di aria. I valori riportati sono medie di 7-10 esperimenti che fornivano risultati concordi. All'apice delle colonnine sono indicati gli errori probabili.

Nella Tabella vengono riportati i valori di deaminazione relativi ad alcuni aminoacidi nei vari organi studiati.

Per tutti gli altri aminoacidi sperimentati, e precisamente: alanina, valina, isoleucina, arginina, treonina, metionina, prolina e tirosina, non è stata dimostrata alcuna significativa extra-formazione di ammoniaca.

L'ordine secondo cui gli aminoacidi si susseguono, per quel che riguarda i valori di attività deaminativa, è diverso da specie a specie e da organo ad organo, per cui sembra improbabile che possa trattarsi di un'unica attività enzimatica. Più verosimilmente i dati riportati lasciano pensare all'esistenza di singole attività enzimatiche.

Altra osservazione che scaturisce dai dati riportati è che non esistono sensibili differenze tra extra-formazione totale di ammoniaca nei pesci elasmobranchi, rispetto a quella nei pesci teleostei. Ciò dimostra che la deaminazione degli aminoacidi naturali non è determinante ai fini del tipo di catabolismo azotato terminale (ureotelismo ed ammoniotelismo) che questi pesci presentano.

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] P. P. COHEN, G. W. BROWN Jr., in *Comparative Biochemistry*, vol. II, p. 161, Academic Press, New York and London, 1960.
- [2] E. BALDWIN, in *Dynamic aspects of Biochemistry*, p. 305, The University Press, Cambridge, England, 1963.
- [3] E. BALDWIN, « *Nature* », 181, 1591 (1958).
- [4] A. P. VANSELOW, « *Industr. & Engin. Chem. Anal. Ed.* », 12, 516 (1940).
- [5] J. G. REINHOLD, C. C. CHUNG, « *Clin. Chem.* », 7, 54 (1961).
- [6] D. SELIGSON, K. HIRAHARA, « *J. Lab. Clin. Med.* », 49, 962 (1957).
- [7] H. A. KREBS, « *Biochem. J.* », 29, 1620 (1935).
- [8] H. A. KREBS, « *Biochem. J.* », 29, 1951 (1935).
- [9] H. TAKAHASHI, S. TANIGUCHI, F. EGAMI, in *Comparative Biochemistry*, vol. V, p. 91, Academic Press, New York and London, 1963.
- [10] V. ZAPPÀ, F. SALVATORE, C. COSTA, M. RICCIO, *Abstracts Sixth International Congress of Biochemistry*, vol. 32 (V-B-58), p. 403, I.U.B. series, New York, 1964.
- [11] D. M. GREENBERG, in *Metabolic Pathways*, vol. II, p. 79, Academic Press, New York and London, 1961.
- [12] F. LEUTHARDT, in *The Enzymes*, vol. I, parte 2, p. 1156, Academic Press, New York, 1951.

SUMMARY. — 1) A study on the comparative biochemistry of natural amino acids has been carried out on an elasmobranch (*Scyllium canicula*) and two teleosts (*Mugil cephalus*, *Gobius niger jazo*). Evidence is presented of deamination in these vertebrates for the first time.

2) Brain, liver and kidney of the above species have been found to deaminate various L-amino acids to varying degrees.

3) L-aspartic acid and L-histidine were generally found to be the most active amino acids on the basis of ammonia production in tissue homogenates. The activity on L-aspartate is worthy of note, in that it has never before been found in animal tissue.