

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica
Sección de Bioquímica. — Madrid.

VI. - Sobre el metabolismo de la fenilalanina en el *Bombyx mori* L.

por M.² D. Stamm Menendez, M. Comenge y A. Santos Ruiz

(Recibido para publicar el día 2 de agosto de 1950)

En una serie de trabajos anteriores, uno de nosotros (M. C.) en colaboración con Ojeda, hizo un estudio del metabolismo global del gusano de seda (3, 4, 5 y 6). Posteriormente, en colaboración con Lorenzo y Ojeda (7), realizó un balance nitrogenado comparativo de la larva del *Bombyx mori* L. y de la hoja de morera que le sirve de alimento, así como del excremento.

Un grado más en el estudio de la materia proteica de dicha larva lo constituye el estudio de los aminoácidos aislados; podrá entonces apreciarse si la hoja los proporciona todos a la larva, tanto cualitativa como cuantitativamente, o si, por el contrario, la larva se ve obligada a realizar síntesis de alguno de ellos.

En la nota presente nos ocupamos del metabolismo de la fenilalanina en el *Bombyx mori* L.

Métodos

I. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

a) *Recogida de muestras.* — Las dos primeras muestras se recogieron el día 20 de abril, en que tuvo lugar la eclosión, tomándose 20 gr. de huevos vacíos y 115 gr. de larvas que inmediatamente fueron muertas por inmersión en éter. El día 4 de mayo las larvas sufrieron la primera muda, que proporcionaron 165 gr.; se recogieron los excrementos eliminados por las larvas en este período de tiempo. La segunda muda se realizó el día 14 de mayo y la cantidad de larvas que se separaron entonces fué de 130 gr., guardándose también muestras de las deyecciones excretadas en esa segunda edad. El día 25 de mayo

las larvas mudaron por tercera vez ; se recogieron 119 gr. de larvas y la muestra correspondiente de heces. A los 11 días, es decir, el 5 de junio, se verificó la cuarta muda y la cantidad de muestra que se tomó entonces supuso 125 gr. de larvas y 300 gr. de excrementos. Por último, cuando observamos iban a comenzar a formar el capullo (14 días después), separamos la última muestra de larvas constituida por 59 unidades, que pesaban 192 gramos y 342 gr. de deyecciones.

Antes de sumergir las larvas en éter se tuvieron varias horas privadas de alimento con objeto de evitar errores al valorar como aminoácidos de la larva los de la hoja de morera que acababan de ingerir. Trece días después de formado el capullo se separaron 303 unidades de las que se sacaron las crisálidas contenidas en su interior, así como las mudas que habían dejado las larvas al verificar la metamorfosis. El resto de los capullos se conservó hasta que tuvo lugar la eclosión espontánea (21 días después de formarse), obteniéndose entonces las dos últimas muestras constituidas por 86 gr. de hembras y 72 gr. de machos.

b) *Desengrasado*. — En el material obtenido, según dejamos indicado, se extrajeron totalmente los lípidos con el Soxhlet. Los disolventes empleados fueron el éter sulfúrico de 65° en el caso de las larvas, capullos y mudas, y este mismo disolvente, seguido después de agotamiento, con acetona anhidra en los excrementos y hoja de morera. El empleo de la acetona anhidra tuvo por objeto privar al resto no lipídico de la clorofila que, de estar presente, falsearía el número de nitrógeno correspondiente a los proteidos.

c) *Desecación previa del material*. — El material a hidrolizar se desecó previamente para evitar posibles errores debidos a la humedad que pudiera haber adquirido en el período de tiempo comprendido entre la extracción de lípidos y la determinación de nitrógeno total. La desecación se realizó en estufa de aire a una temperatura comprendida entre 50 y 60° en la primera media hora y entre 90 y 105° en la hora siguiente, hasta peso constante.

d) *Determinación global de proteidos*. — La determinación de los proteidos totales se llevó a cabo valorando el nitrógeno por el método de Kjeldahl, empleando el sulfato de cobre como catalizador. Para el cálculo de las proteínas animales se asignó el factor 6,25 y para las de la hoja de morera y excrementos, 5,68.

e) *Hidrólisis proteídica*. — La hidrólisis de los proteidos se realizó según el procedimiento indicado en la adaptación de Block y Bolling (1) al método de Millong-Lugg (9).

Se emplearon 2 cc. de sosa 5N por cada cien miligramos de proteínas calculados y se mantuvo el conjunto a una temperatura comprendida entre 110 y 125° en baño de aceite durante cinco horas (*). Terminado este período, se filtró el hidrolizado a través de lana de vidrio, con objeto de separar las materias húmicas formadas en la hidrólisis. El método recomienda acidificar entonces el hidrolizado con 3 cc. de sulfúrico 7N por cada 2 cc. de sosa 5N empleada, pero en nuestro caso la acidificación se realizó en el momento de hacer la valoración con cada porción analizada, con objeto de asegurar la conservación del triptofano, que es poco estable en medio ácido. Es decir, el hidrolizado se mantuvo en medio alcalino hasta el momento de utilizarlo en la valoración.

II. TÉCNICAS

En todos los hidrolizados se determinó el nitrógeno total y el nitrógeno amínico, el primero por el método de Kjeldahl y el segundo por el de Van Slyke (10). Dividiendo el número de nitrógeno amínico por el de nitrógeno total se obtuvo el porcentaje de hidrólisis.

Para la valoración de la fenilalanina en los hidrolizados, los métodos utilizados han sido de tipo químico colorimétrico, y en todos ellos se empleó el celofotómetro de Klett-Summerson. La comparación se hizo mediante una curva determinada con arreglo a una solución patrón de fenilalanina que contenía 0,4936 gr. % de fenilalanina pura.

Técnica analítica. — El método seguido en la valoración fué la adaptación de Block y Bolling (2) al método Kapeller-Adler-Kuhn (8), fundado en que la fenilalanina tratada con mezcla sulfonítrica se transforma en el 3-4 dinitro derivado de color amarillo. Este color se desarrolla e intensifica con la adición de clorhidrato de hidroxilamina en medio amoniacal.

(*) Para evitar la formación de espuma al comenzar la hidrólisis, antes de poner la mezcla de proteínas y sosa en el baño de aceite se le añadieron unas gotas de alcohol octílico.

Resultados

En los cuadros y gráficas que siguen se resumen los resultados obtenidos

CUADRO 1

CONTENIDO DE FENILALANINA POR MIL LARVAS

Cáscaras huevo.	3,0187 gr.	Quinta edad	18,04 »
Eclósión	0,0097 »	Crisálidas.	11,80 »
Primera edad	0,051 »	Capullos	10,23 »
Segunda edad	0,25 »	Mudas	0,51 »
Tercera edad	1,26 »	Hembras	10,41 »
Cuarta edad	5,65 »	Machos.	5,65 »

CUADRO 2

FENILALANINA EXCRETADA POR MIL LARVAS

Primera edad	0,049 gr.
Segunda edad	0,32 »
Tercera edad	1,38 »
Cuarta edad.	4,35 »
Quinta edad	43,94 »

CUADRO 3

PROTEÍDOS INGERIDOS POR MIL LARVAS

Primera edad	2,89 gr. %
Segunda edad	9,89 » »
Tercera edad	37,25 » »
Cuarta edad	128,61 » »
Quinta edad	928,95 » »

CUADRO 4

FENILALANINA INGERIDA POR MIL LARVAS

Primera edad	0,34 gr.
Segunda edad	1,19 »
Tercera edad	4,49 »
Cuarta edad	15,52 »
Quinta edad	112,12 »

CUADRO 5

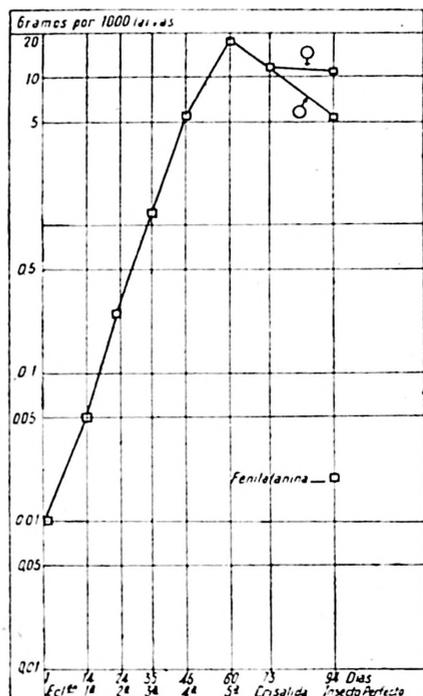
FENILALANINA ASIMILADA POR MIL LARVAS

Primera edad	0,299 gr.
Segunda edad	0,87 »
Tercera edad	3,11 »
Cuarta edad	11,17 »
Quinta edad	68,18 »

CUADRO 6

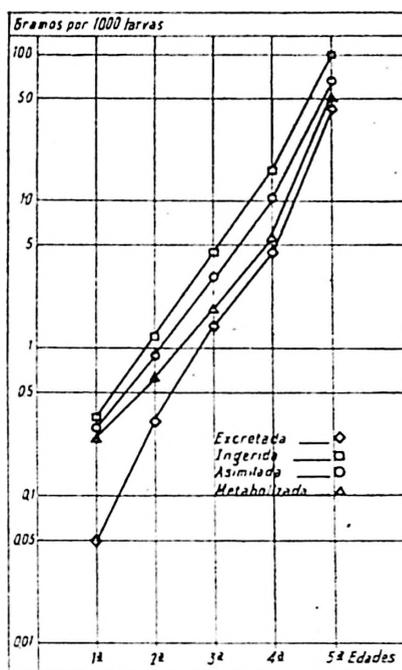
FENILALANINA METABOLIZADA POR MIL LARVAS

Primera edad	0,248 gr.
Segunda edad	0,62 »
Tercera edad	1,85 »
Cuarta edad	5,52 »
Quinta edad	50,14 »



Gráfica 1

Metabolismo de la fenilalanina en el Bombyx mori L.



Gráfica 2

Fenilalanina excretada, ingerida, asimilada y metabolizada por el Bombyx mori

Discusión

La gráfica 1 trazada con los valores calculados para mil larvas, en cada una de las seis fases por las que pasa el *Bombyx mori L.* hasta completar su desarrollo, nos permite deducir, entre otras posibles consideraciones, que la curva de fenilalanina nos muestra un ascenso rápido desde la eclosión hasta la quinta edad. A partir de ésta, experimenta un descenso no muy pronunciado hasta la fase de crisálida, descenso que se continúa de las crisálidas al insecto perfecto, siendo mucho más pronunciado en los machos que en las hembras.

Comparando las cantidades de fenilalanina contenidas en las crisálidas, capullos y mudas, con aquellas otras cifras encontradas en la larva en su quinta edad (Cuadro 1), se observa que la suma de los tres valores (crisálidas + capullos + mudas) es ligeramente superior al encontrado en la quinta edad. Como las larvas al llegar a esta fase comienzan ya el hilado, dejando de alimentarse, es posible que este incremento se deba a síntesis de fenilalanina.

La gráfica 2 representa la fenilalanina ingerida, excretada,

asimilada y metabolizada por la larva. Todas las curvas siguen un camino casi paralelo, observándose que la cifra de fenilalanina excretada es inferior a la ingerida; esta cifra es superior a la asimilada y ésta a su vez es mayor que la metabolizada.

Las cifras de fenilalanina excretada e ingerida fueron calculadas con arreglo a los números de proteínas que ingieren mil larvas y que fueron obtenidos por uno de nosotros (4). La fenilalanina asimilada se obtuvo por diferencia entre la ingerida y la excretada la metabolizada, a partir de la asimilada y los valores encontrados en la larva.

Las curvas han sido obtenidas colocando en abscisas los días que duró cada fase y en ordenadas las cantidades de fenilalanina encontrada, utilizando papel semilogarítmico.

Conclusiones

- 1.^a No hay síntesis de fenilalanina en ninguna de las cuatro primeras fases del desarrollo del *Bombyx mori* L.
- 2.^a En la quinta edad parece haber síntesis de fenilalanina.
- 3.^a La cantidad de fenilalanina que ingiere, excreta, asimila y metaboliza el *Bombyx mori* L. aumenta progresivamente hasta la quinta edad.

Summary

It is concluded that phenylalanine is not synthesized by the larva of *Bombyx mori* L. during its first four stages of life. On the contrary it appears as if phenylalanine is synthesized in the fifth stage. The ingestion and the assimilation of phenylalanine by the larva have also been studied.

Bibliografía

- (1) BLOCH, R. J.: *The Determination of the Amino Acids*. Burgess Publishing Co., Minneapolis. Minn. 1938.
- (2) BLOCH, R. J. y BOLLING, D.: *The Determination of the Amino Acids*. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Min. 1940.
- (3) COMENGE, M. y OJEDA, E.: *Rev. esp. Fisiol.* **3**, 145. 1947.
- (4) " " " " " " " " **3**, 351. 1947.
- (5) " " " " " " " " **4**, 109. 1948.
- (6) " " " " " " " " **4**, 117. 1948.
- (7) COMENGE, LORENZO y OJEDA: *Rev. esp. Fisiol.* **6**, 1950.
- (8) KAPPELLER-ADLER, R.: *Biochem. Z.* **252**, 185. 1932.
- (9) LUGG, J. W. H.: *Biochem. J.* **31**, 1423. 1937.
- (10) VAN SLYKE, D. D.: *J. Biol. Chem.* **16**, 121. 1913-14.