

**ANGELO STRUSI**  
**(Istituto Sperimentale Talassografico di Taranto)**

METODO PER LA DETERMINAZIONE DEL GLICOGENO  
NEI MITILI E SUE VARIAZIONI IN RAPPORTO  
AL CONTENUTO IN GRASSI

E' apparso utile, nel quadro delle ricerche intraprese dall'Istituto sui prodotti alimentari di origine marina, studiare una metodica che consenta la estrazione totale del glicogeno dai tessuti dei mitili e la sua susseguente determinazione quantitativa per via colorimetrica.

Il glicogeno, o amido animale, è un polisaccaride che si trova massimamente concentrato nel fegato e nei muscoli. La sua genesi, oggi sufficientemente chiarita, è il risultato di un complesso meccanismo di « reazioni reversibili » che consentono la trasformazione del glucosio in una molecola più complessa e che, sotto certi aspetti, viene considerata come materiale di riserva, nel senso che ,attraverso processo di conversione (glicolisi), le cellule, in condizioni particolari, utilizzano, per il loro fabbisogno energetico, il glicogeno nella forma più semplice qual'è quella che si riferisce al glucosio.

Sino ad oggi sembra che non siano stati approfonditi i rapporti fra il contenuto in glicogeno e sviluppo dei mitili, e cioè, se una percentuale del polisaccaride coincida con il periodo di maggiore commerciabilità del prodotto. Si è però certi che ad un alto contenuto di grassi fa riscontro parimenti un aumento del glicogeno, il che conferirebbe ai mitili caratteri di sapidità, di maggior pregio. Posto ciò, il presente studio ha un duplice

scopo: quello che si riferisce alla messa a punto di una metodica seriale semplice che dia risultati riproducibili del tasso glicogenico e l'altro, non meno importante, di accertare se vi sia un rapporto diretto tra l'accumulo del glicogeno e i lipidi.

## PARTE SPERIMENTALE

### A) - *Metodi di estrazione del glicogeno*

Allo scopo di eliminare l'eventuale influenza di fattori ambientali, i campioni dei mitili sono stati prelevati in una zona di allevamento del Mar Piccolo, da un'unica corda e in epoche successive.

Il criterio di estrazione del glicogeno mediante dispersione con una soluzione di  $\text{CaCl}_2$ , a pH 2-3, suggerito da Fraser J. R. (1), non ha dato ottimi risultati, nel senso che, nel recupero della sostanza, le percentuali risultano essere molto basse. Forse ciò è dovuto al fatto che se è vero che la soluzione di  $\text{CaCl}_2$  disperde il glicogeno, è altrettanto vero che porta in soluzione anche notevoli quantità di frazioni proteiche, per cui si è costretti alle precipitazioni che, inevitabilmente, portano seco sensibili quantità di glicogeno.

La digestione dei campioni dei mitili con KOH al 60% e le successive e ripetute precipitazioni con alcool etilico al 95% consentono, viceversa, la estrazione e il recupero totale del glicogeno. Infatti i mitili sgusciati vengono asciugati su carta da filtro al fine di eliminare la maggior parte dell'acqua che aderisce alla superficie, che altrimenti si sommerebbe a quella contenuta nelle cellule. Indi una aliquota si pone in un palloncino di vetro con KOH al 60% pari a 2 cc. per ogni grammo di carne.

Si lascia bollire sul b. m. per due ore circa avendo cura di porre sul palloncino un tubo a ricadere. Il materiale così digerito, raffreddato, si porta a volume in un palloncino tarato, dal quale se ne prelevano 10 cc. che vengono posti in un tubo da centrifuga di 50 cc. Si portano all'ebollizione sul b.m. e indi

si aggiungono 12 cc. di alcool etilico al 95% in maniera da far precipitare il glicogeno estratto. Lasciar raffreddare e indi si centrifuga per 10 minuti ad una velocità di circa 3.500 giri. Si decanta il liquido supernatante e il precipitato viene ridiscioltto con 10 cc. di acqua distillata. Il tubo viene riposto sul b.m. e, all'ebollizione, si aggiungono, ancora una volta, 12 cc. di alcool etilico 95% e il precipitato raccolto per centrifugazione come dianzi detto. Sono sufficienti due operazioni di precipitazione e di soluzione per ottenere il glicogeno allo stato puro. Poi si passa alla idrolizzazione acida mediante l'aggiunta di 20 cc. di  $H_2SO_4$  5N e si lascia bollire sul b.m. per mezz'ora. Si raffredda, si neutralizza con NaOH al 40% e si porta a volume in un palloncino tarato.

B) - *Determinazione del glucosio.*

Si preparano le seguenti soluzioni :

1. - Soluzione alcalina:

Carbonato di Sodio anidro	gr. 35
Tartrato di Sodio	» 13
Bicarbonato di Sodio	» 11
e portare 1000 cc. con acqua distillata.	

2. - Soluzione fosfomolica:

Molibdato di Sodio	gr. 150
Acido fosforico all'85%	cc. 230
Acido solforico al 25%	» 150
Acido acetico	» 70
$H_2O$ dist.	» 500

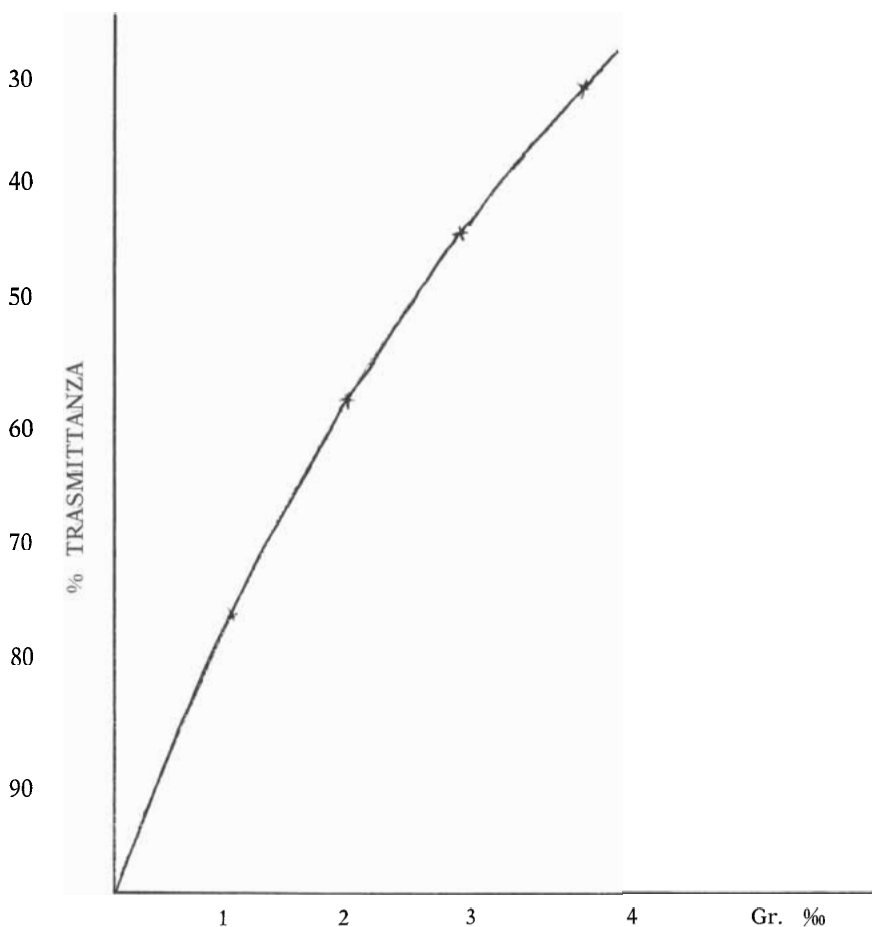
3. - Soluzione di  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  al 5% con l'aggiunta di poche gocce di  $H_2SO_4$  conc.

Si pongono 5 cc. di  $H_2SO_4$  N/12 in due provette e vi si aggiunge, in una, 0,8 cc. di  $H_2O$  dist. (prova in bianco), nell'altra 0,3 cc. di soluzione di glicogeno idrolizzato e 0,5 cc. di  $H_2O$  dist. Da ambedue le provette si preleva 1 cc. e si pone in

altre due provette. A parte si prepara, volta per volta, una soluzione costituita da 1 cc. di  $\text{CuSO}_4$  al 5% e 9 cc. di soluzione alcalina. Si aggiungono 2 cc. di tale soluzione nelle due provette, si riscalda a b. m. per 10 minuti esatti, si raffredda e si aggiungono 2 cc. di soluzione fosfomolibdica, si agita e, infine, si aggiungono 10 cc. di  $\text{H}_2\text{O}$  dist. Si agita nuovamente e dopo 10 minuti si legge al colorimetro a 470 m $\mu$ .

Per preparare la curva di taratura si allestiscono 4 soluzioni contenenti rispettivamente 1, 2, 3, 4 gr / ‰ di glucosio.

Eseguite le operazioni secondo quanto innanzi indicato, si costruisce una curva simile a quella riportata nella figura 1.



Figg. 1: Curva di taratura del glucosio.

## RISULTATI OTTENUTI

Nello sviluppo della presente indagine, come detto precedentemente, si è creduto opportuno prendere in considerazione un dato relativo alle variazioni della quantità dei lipidi, e ciò al fine di poter stabilire e valutare una eventuale correlazione con le percentuali di glicogeno durante la crescita dei mitili.

I valori riportati nella seguente tabella sono stati ottenuti dalla media dei dati riscontrati mensilmente su campioni omogenei :

*Tabella 1.*

### CONTENUTO DI LIPIDI E GLICOGENO IN MITILI DEL MAR PICCOLO DI TARANTO

<i>Mesi 1968-69</i>	<i>Umidità %</i>	<i>Peso secco %</i>	<i>LIPIDI</i>		<i>GLICOGENO</i>		<i>Peso di 1 esemplare gr. %</i>
			<i>sul t. q. gr. %</i>	<i>sul secco gr. %</i>	<i>sul t. q. gr. %</i>	<i>sul secco gr. %</i>	
NOV.	79,80	20,20	0,62	3,07	0,686	3,39	3,67
DIC.	82,40	17,60	0,58	3,29	0,297	1,69	3,51
GEN.	81,27	18,73	1,32	7,04	0,057	3,51	2,75
FEB.	82,72	17,28	1,08	6,25	1,671	9,67	3,39
MAR.	77,71	22,29	2,29	10,00	4,633	20,80	4,07
APR.	76,84	23,16	2,04	8,81	4,200	18,10	4,60
MAG.	72,09	27,91	4,80	17,19	6,562	23,51	7,20
GIU.	74,56	25,44	7,52	29,56	6,453	25,36	6,95
LUG.	72,29	27,71	6,74	24,32	6,038	21,74	6,29
AGO.	76,91	23,09	7,03	30,44	6,697	20,34	6,30
SET.	74,40	23,60	4,60	19,49	4,405	18,66	5,00
OTT.	79,60	20,40	3,30	16,17	2,892	14,17	4,10
NOV.	80,10	19,90	2,10	10,55	1,601	8,04	3,90
DIC.	81,60	18,40	1,80	9,78	1,924	10,45	3,10

Le variazioni riscontrate nel contenuto in glicogeno e in lipidi durante le varie fasi di accrescimento dei mitili, sono particolarmente evidenziate nel seguente grafico I :

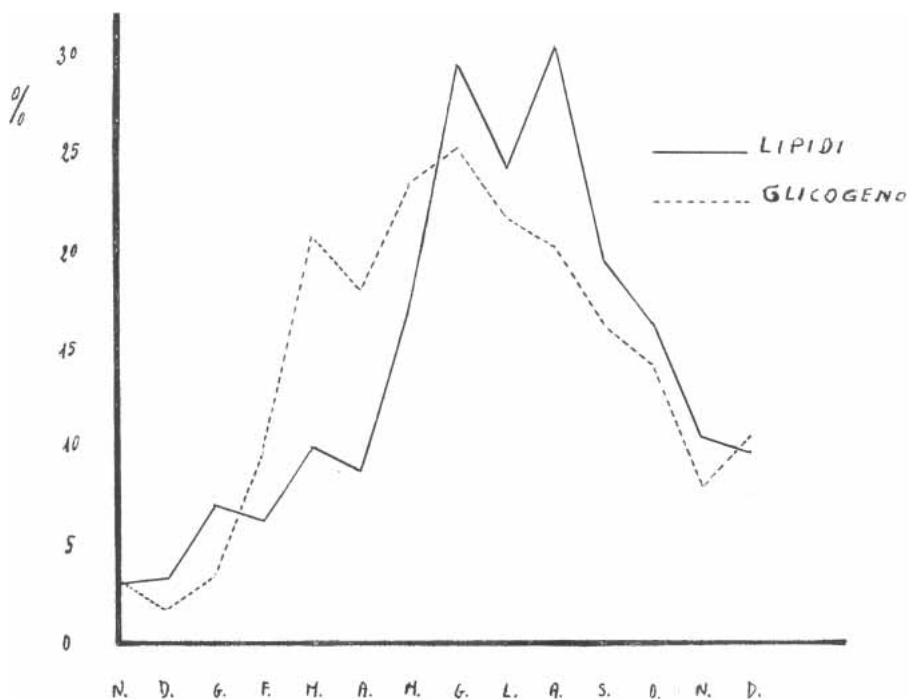


GRAFICO I. - Andamento mensile dei lipidi e dei grassi nei mitili.

L'andamento del contenuto in glicogeno e in grassi, riferito al secco, nei mitili coltivati nel Mar Piccolo di Taranto, è rappresentato da un aumento continuo e costante. I valori più bassi si riscontrano nei mesi invernali, e cioè in coincidenza con la emissione dei prodotti sessuali.

In particolare, per quanto si riferisce alle variazioni del tasso di glicogeno, è stato riscontrato, a partire dal mese di febbraio, un forte incremento, allorquando, molto probabilmente, ha inizio il periodo del riposo sessuale.

Tale incremento raggiunge il massimo nel mese di giugno, poi incomincia a decrescere nei mesi successivi e cioè all'inizio di quel particolare fenomeno che va sotto il nome di gametogenesi. Infine si riscontrano valori bassi nei mesi di novembre, allorquando i mitili emettono i primi prodotti sessuali.

Le stesse indicazioni varrebbero per i lipidi in quanto dal grafico si può facilmente osservare che le variazioni mensili del contenuto di tali sostanze si susseguono pressapoco con lo stesso ritmo, salvo il fatto che gli aumenti più significativi sono stati riscontrati a partire dal mese di aprile, raggiungendo punte elevate durante il periodo maggio-agosto per indi ritornare ai valori decisamente più bassi dei mesi successivi. Quindi per i lipidi la diminuzione progressiva risulterebbe in coincidenza con un periodo in cui ha inizio il ciclo della riproduzione sessuale.

Dalle risultanze della presente indagine si potrebbe concludere :

- 1) che il glicogeno, il cui contenuto è massimo nel periodo del riposo sessuale e va successivamente diminuendo raggiungendo i valori minimi in coincidenza del periodo relativo all'instaurarsi dei fenomeni della gametogenesi, viene utilizzato dai mitili ai fini delle complesse attività metaboliche dei prodotti sessuali. Ciò anche in accordo con quanto trovato da Renzoni (1961);
- 2) che il tasso di lipidi segue un andamento analogo, sicché sono da considerarsi anch'essi materiale di riserva e sono consumati ai fini della riproduzione sessuale. In altri termini, sarebbe come dire che in questo periodo, nei mitili, ogni attività metabolica è rivolta a un unico fine, cioè quello della perpetuazione della specie;
- 3) le variazioni di glicogeno e di grassi, dal punto di vista quantitativo, durante lo sviluppo dei mitili, a parte una lieve sfasatura negli incrementi riferiti ai tempi, presentano una proporzionalità diretta con valori massimi che coinciderebbero con il periodo cosiddetto di maturazione, conferendo ad essi quelle caratteristiche di degustazione apprezzate dai buongustai;

- 4) il peso unitario dei mitili aumenta progressivamente raggiungendo valori massimi durante il periodo che va dai mesi di maggio-giugno-luglio e agosto, per poi ridiscendere quasi ai valori iniziali. E' evidente che tale parametro è della massima importanza quando si voglia prendere in considerazione la commerciabilità dell'animale in relazione al suo peso massimo raggiungibile.

### RIASSUNTO

E' stata messa a punto una metodica per l'estrazione e la successiva determinazione del glicogeno nei mitili.

Dalle osservazioni periodiche sui mitili coltivati nel Mar Piccolo di Taranto risulta che il contenuto in glicogeno raggiunge valori elevati durante il riposo sessuale. Analogo andamento si è riscontrato per quanto si riferisce ai lipidi. Infine, l'aumento continuo del peso unitario dell'animale è costante a partire da maggio fino ad agosto.

### SUMMARY

A method for drawing and determining glycogen in Mussel is shown.

By periodical examinations on cultivated mussels in Mar Piccolo, it has resulted that the glycogen tenor is reading high value during the intergenetic stage. In according with glycogen is the lipids proceeding At last, by may at august, the animals are increasing their standard weight in a constant manner.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) FRASER J.R. et HOLMES D.C. - *Analyst*, 86, 131, (1961).
- 2) RENZONI A. - *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, vol. 32, 9 (1961).