

Istituto di Chimica agraria e Industrie agrarie, Università di Padova, Italia

Attività e forme molecolari multiple di α -amilasi, α -glucosidasi e invertasi dell'uva in maturazione¹⁾

di

A. DAL BELIN PERUFFO e C. PALLAVICINI

Activities and multiple molecular forms of α -amylase, α -glucosidase and invertase during ripening of grape berries

SUMMARY. — Changes in multiple forms and specific activities of invertase, α -amylase and α -glucosidase were followed during the ripening of Tokay grape berries. Different ripening stages of grape were accompanied by variations in the number of isoenzyme bands as well as in the level of activity of the enzymes examined. The activity levels of both α -amylase and α -glucosidase are discussed in relation to the literature data on starch content in grape.

Introduzione

In un lavoro precedente (DAL BELIN PERUFFO e PALLAVICINI 1975) è stata seguita l'evoluzione delle forme molecolari di quattro enzimi durante la maturazione dell'uva Folle Blanche. In questo intervallo di tempo, nella bacca compaiono nuove varianti isoenzimatiche di malato deidrogenasi, fosfatasi acida e glutammato deidrogenasi e aumenta gradualmente l'attività dell'unica variante di leucina-aminopeptidasi.

Per gli enzimi coinvolti nel metabolismo del saccarosio e dell'amido nell'uva, mancano notizie analoghe, sebbene siano note le variazioni che subisce la loro attività totale (HAWKER 1969, DOWNTON e HAWKER 1973). Inoltre, non esistono dati sulla attività di α -glucosidasi, anch'essa coinvolta nel metabolismo dell'amido in quanto catalizzatore della idrolisi dei prodotti dell'attività amilasica e cioè maltosio e oligo-saccaridi correlati.

Questo lavoro è stato condotto allo scopo di correlare al metabolismo del saccarosio e dell'amido le variazioni che subiscono le forme molecolari di α -amilasi, α -glucosidasi e invertasi durante l'accrescimento e la maturazione della bacca. In parallelo, è stata dosata l'attività specifica dei tre enzimi.

Materiali e metodi

Uva

Campioni d'uva (*Vitis vinifera* var. Tocai) raccolti quindicinalmente da tre viti a partire dal 31 Luglio (inviatura) fino al 19 settembre (maturazione tecnologica) 1976 sono stati conservati secondo la procedura di ARNOLD (1965) e sottoposti all'estrazione degli enzimi nel più breve tempo possibile.

Estrazione degli enzimi

Ogni estrazione è stata eseguita omogeneizzando 150 g di uva privata dei vinaccioli per 3 min in presenza di 250 ml di tampone Na-acetato 0,35 M pH 5,4 contenen-

¹⁾ Lavoro eseguito con il contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

te il 10 % (v/v) di glicerina, 1 mM $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$, 10 mM Na-dietilditiocarbammato, 10 mM cisteina $\cdot \text{HCl}$ e il 6 % di Carbowax 4000. Quando è stato necessario, si è riportato il pH dell'omogenato a 5,4 con Na-acetato solido. Dopo l'omogeneizzazione, il materiale è stato filtrato su garza e quindi centrifugato a 12000 g per 15 min. Il surnatante è stato saturato con solfato ammonico fino all'80 % (56,1 g/100 ml). Dopo 2 h, il precipitato è stato raccolto mediante centrifugazione a 27000 g per 15 min e sciolto in tampone acetato 0,15 M pH 5,4 contenente il 10 % di glicerina. A questa soluzione raffreddata a 6 °C, si è aggiunto lentamente dell'acetone freddo fino a raggiungere una concentrazione del 66 %. Dopo 20 min, il precipitato è stato recuperato per centrifugazione a 27000 g per 15 min e solubilizzato in tampone Na-acetato 0,025 M pH 5,4 contenente il 5 % di glicerina. Questa soluzione è stata dializzata per 14 h contro lo stesso tampone, poi concentrata fino a circa 9 ml contro polietilenglicole 20000 e quindi seminata su una colonna di Sephadex G-150 (1,6 \times 56 cm) equilibrata col tampone usato per la dialisi. Con lo stesso tampone è stata effettuata l'eluizione delle proteine raccogliendo frazioni da 4,3 ml.

Sulle frazioni di eluato è stato rilevato il profilo proteico (assorbanza a 280 nm) e quello relativo all'attività di α -glucosidasi. Per questo enzima il metodo di colorazione su gel di poliaccrilamide (GABRIEL 1971) non forniva sempre risultati riproducibili.

Le variazioni di α -amilasi e invertasi sono state seguite mediante elettrofocalizzazione su gel di poliaccrilamide delle frazioni del profilo proteico riunite e concentrate fino a circa 9 ml. Questo estratto all'elettrofocalizzazione dava patterns con bande meglio differenziate di quanto era possibile ottenere con l'estratto non sottoposto a gel filtrazione. Sullo stesso estratto è stata determinata l'attività specifica dei tre enzimi.

Salvo quanto diversamente riportato, tutte le operazioni sono state eseguite a 4 °C.

Determinazione delle attività enzimatiche

Il contenuto proteico è stato calcolato assumendo che al valore 1,0 di assorbanza corrisponda una concentrazione in proteina di 1 mg/ml (PINSKY *et al.* 1973).

Determinazione delle attività enzimatiche

α -Amilasi (E.C.3.2.1.1.). — Questo enzima è stato determinato secondo il metodo di SNELL e SNELL (1971) usando tampone tris-acetato 0,1 M pH 6,8 anziché tampone fosfato. Gli estratti enzimatici preparati come su riportato non contenevano attività β -amilasica, com'è stato accertato trattandoli come indicato da WILSON (1971). In presenza di Tris e a pH 6,8, l' α -glucosidasi non interferisce con l'attività amilasica (DAL BELIN PERUFFO *et al.* 1978). Le unità sono state espresse come μmol di maltosio liberato $\times \text{min}^{-1}$ a 40 °C. L'attività specifica è stata espressa come unità $\times \text{mg}$ proteina $^{-1}$.

α -Glucosidasi (E.C.3.2.1.20). — Il dosaggio dell'attività α -glucosidasica è stato eseguito usando una miscela di reazione contenente 1 ml di maltosio all'1 %, 2 ml di tampone citrato 0,2 M pH 4,5 e 1 ml di estratto enzimatico. Le aliquote di estratto sono state sempre opportunamente diluite al fine di avere la stessa quantità di proteina nella miscela di incubazione.

Dopo incubazione è stato determinato il glucosio con il metodo di LLOYD e WHELAN (1969). Le unità sono state espresse come μmol di maltosio idrolizzato $\times \text{min}^{-1}$ a 40 °C. L'attività specifica è stata espressa come unità $\times \text{mg}$ proteina $^{-1}$.

Invertasi (E.C.3.2.1.26). — L'attività dell'invertasi è stata dosata come descritto da ARNOLD (1965). Le unità sono state espresse come μmol di saccarosio idro-

lizzato $\times \text{min}^{-1}$ a 40 °C. L'attività specifica è stata espressa come unità $\times \text{mg}$ proteina $^{-1}$.

Elettrofocalizzazione su gel di poliacrilamide

L'elettrofocalizzazione su gel di poliacrilamide al 7,5 % contenente il 2,5 % di anfoline pH 3,5—10 è stata eseguita come riportato precedentemente (DAL BELIN PERUFFO e PALLAVICINI 1975). Per ogni tubicino di gel sono stati seminati 300 μg di proteine. 491—79 — Spalte 2

Zimogrammi di α -amilasi e di invertasi

Sui gels dopo elettrofocalizzazione è stata visualizzata la attività α -amilasica col metodo di VAN ONCKELEN e VERBEEK (1969) e quella dell'invertasi impiegando il metodo di GABRIEL (1971). I gels controllo sono stati incubati nelle rispettive miscele di reazione prive di substrato.

Determinazione degli zuccheri riducenti

Il contenuto in zuccheri riducenti è stato dosato secondo il metodo riportato da HAWKER (1969).

Risultati e discussione

Invertasi

Come è visibile dalla Fig. 1 il tenore in zuccheri riducenti è piuttosto basso (1—5 %) nei campioni d'uva raccolti all'invaiaura (31.7) e 2 settimane dopo (15.8).

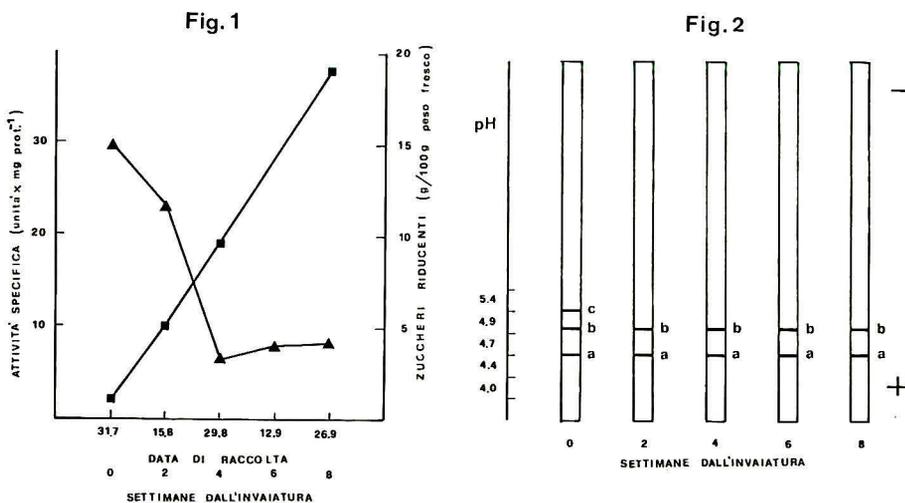


Fig. 1: Attività dell'invertasi (— \blacktriangle — \blacktriangle —) e contenuto in zuccheri riducenti (— \blacksquare — \blacksquare —) dell'uva Tocai durante la maturazione.

Fig. 2: Patterns da gel elettrofocalizzazione dell'invertasi dell'uva Tocai durante la maturazione.

Fig. 1: Invertase activities (— \blacktriangle — \blacktriangle —) and reducing sugar contents (— \blacksquare — \blacksquare —) in ripening Tokay grape.

Fig. 2: Isoelectric focusing patterns of invertase in ripening Tokay grape.

A partire da quest'ultima data e fino alla completa maturazione dell'acino, il loro contenuto aumenta via via fino a raggiungere il valore massimo del 19%. L'evoluzione degli zuccheri riducenti nell'uva Tocai è quindi identica a quella accertata nell'uva Sultanina (HAWKER 1969).

L'attività specifica dell'invertasi segue un andamento opposto a quello degli zuccheri riducenti (Fig. 1). Essa è massima alla invaiatura (30 unità circa), diminuisce fino a toccare il valore minimo fra l'invaiatura e la maturazione completa (7,5-8 unità), risale leggermente a maturazione completa (9 unità circa).

All'invaiatura l'enzima è presente con tre varianti (Fig. 2). Dopo questa data, una banda scompare definitivamente mentre le due restanti appaiono invariate fino a completa maturazione. Tutte le varianti di invertasi esistono come proteine acide con punti isoeletrici compresi fra 4,5 e 5 di pH.

I risultati esposti indicano che la caduta della attività specifica dopo l'invaiaura è correlata alla contemporanea scomparsa della variante (c) dell'enzima e, inoltre, che la stessa variante è con ogni probabilità repressa da glucosio e/o fruttosio, analogamente all'isoenzima II dell'invertasi di radici di pomodoro (WESTON e CHIN 1975) e a una delle forme multiple dell'invertasi della canna da zucchero (SACHER *et al.* 1963).

α -Amilasi e α -Glucosidasi

Le curve dell'attività specifica di α -amilasi e α -glucosidasi sono pressoché parallele (Fig. 3) e a tutte le date esaminate l'attività del primo enzima risulta leggermente più elevata di quella del secondo. Ambedue gli enzimi presentano la massima attività a metà strada circa del periodo di tempo compreso fra l'invaiaura e la maturazione completa dell'uva.

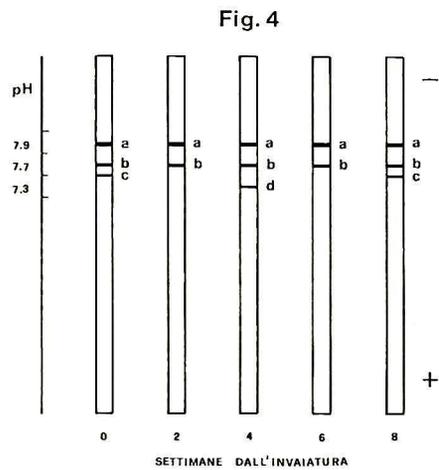
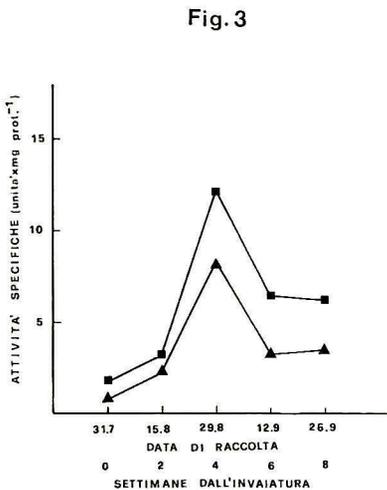


Fig. 3: Attività di α -amilasi (—■—■—, unità $\times 10^{-2}$) e di α -glucosidasi (—▲—▲—, unità $\times 10^{-3}$) dell'uva Tocai durante la maturazione.

Fig. 4: Patterns da gel elettrofocalizzazione dell' α -amilasi della uva Tocai durante la maturazione.

Fig. 3: α -Amylase (—■—■—, unit $\times 10^{-2}$) and α -glucosidase (—▲—▲—, unit $\times 10^{-3}$) activities in ripening Tokay grape.

Fig. 4: Isoelectric focusing patterns of α -amylase in ripening Tokay grape.

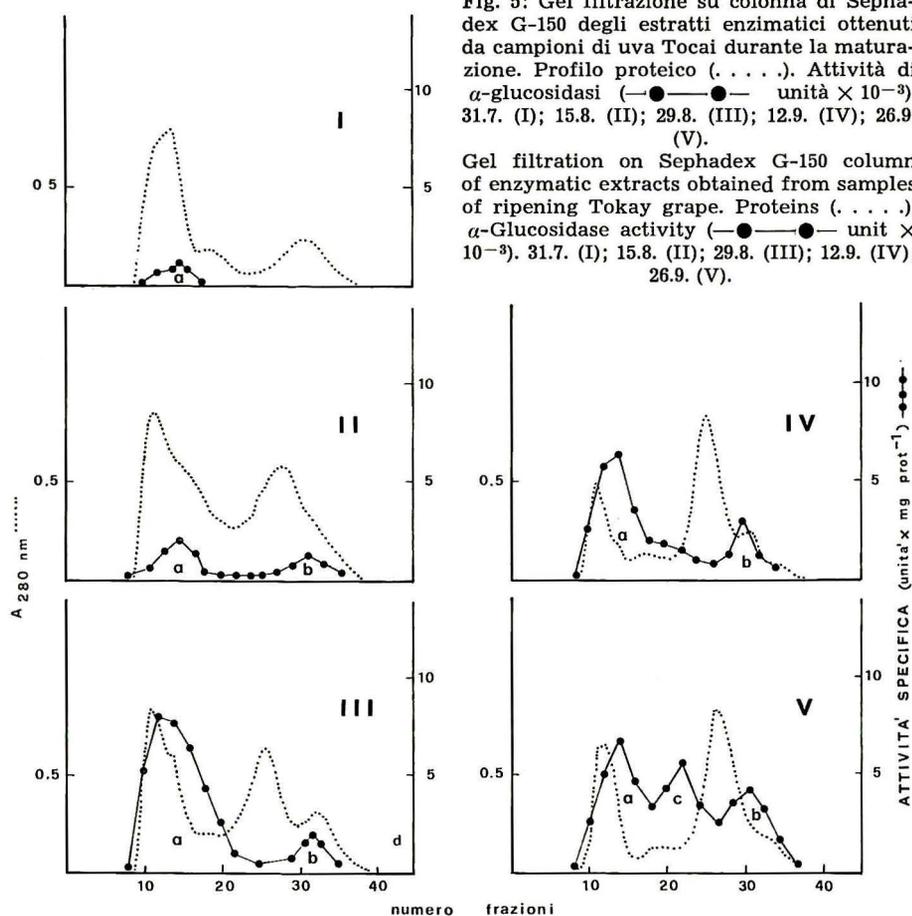


Fig. 5: Gel filtrazione su colonna di Sephadex G-150 degli estratti enzimatici ottenuti da campioni di uva Tocai durante la maturazione. Profilo proteico (.....). Attività di α -glucosidasi (—●—●— unita' $\times 10^{-3}$). 31.7. (I); 15.8. (II); 29.8. (III); 12.9. (IV); 26.9. (V).

Gel filtration on Sephadex G-150 column of enzymatic extracts obtained from samples of ripening Tokay grape. Proteins (.....). α -Glucosidase activity (—●— unit $\times 10^{-3}$). 31.7. (I); 15.8. (II); 29.8. (III); 12.9. (IV); 26.9. (V).

I patterns isoenzimatici di α -amilasi sono caratterizzati da fluttuazioni (da 2 a 3) nel numero delle bande (Fig. 4). La banda (c) presente all'invaiaitura e a maturazione completa non è stata rilevata alle restanti date di raccolta dei campioni. Nel campione di uva a maturazione intermedia è presente una variante (d) dotata di un punto isoelettrico che si discosta leggermente da quello della banda (c). Questa nuova variante, non più visibile successivamente, potrebbe essere responsabile del sensibile aumento di attività specifica osservato alla medesima data di raccolta.

Tutte le varianti osservate nell'uva Tocai usata in questo lavoro sono proteine leggermente basiche differenziandosi in questo da quelle dell'uva Riesling (DAL BELIN PERUFFO *et al.* 1978) che focalizzano fra 5,5 e 6,5 di pH.

I patterns da gel filtrazione dell' α -glucosidasi sono visibili nella Fig. 5. All'invaiaitura dell'uva l'enzima è presente come picco singolo, mentre alle tre successive date di raccolta dei campioni l'enzima ha due picchi di attività. A maturazione completa si osservano tre picchi di attività α -glucosidasica. Estratti parzialmente purificati di uva Riesling matura sottoposti a gel elettrofocalizzazione mostrano soltanto due siti di attività, quando fette di gel sono incubate nella miscela di reazione costituita da maltosio all'1 % in tampone McIlvaine pH 5 (DAL BELIN PERUFFO *et al.* 1978).

Secondo DOWNTON e HAWKER (1973) della scarsa quantità di amido nella bacca (meno di 0,03 mg/g peso fresco) sono responsabili le basse attività di ADP glucosio-pirofosforilasi e ADP glucosio-amido glucosiltransferasi. D'altro canto SWIFT *et al.* (1973) mediante microscopia ottica hanno constatato una notevole presenza di granuli d'amido nell' uva acerba, che diminuisce gradualmente col procedere della maturazione del frutto.

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano che l' attività α -amilasica dell' uva Tocai matura è superiore a quella accertata nell' uva Cabernet Sauvignon (DOWNTON e HAWKER 1973). Inoltre, se raffrontata con l' attività α -amilasica, risulta discretamente rappresentata anche l'attività dell' α -glucosidasi.

Sembra quindi che nell' uva esistano anche le condizioni per una rapida degradazione dell' amido a zuccheri semplici per via idrolitica (MANNERS 1974).

Sommario

A partire dall' invecchiamento fino alla completa maturazione dell' uva Tocai sono stati seguiti i cambiamenti relativi alle forme multiple e alle attività specifiche di invertasi, α -amilasi e α -glucosidasi. All' invecchiamento l'invertasi è presente con tre varianti isoenzimatiche, una delle quali scompare subito dopo. Tale scomparsa si verifica in concomitanza con la rapida diminuzione dell' attività dell' enzima e col simultaneo consistente aumento nell' acino del contenuto in zucchero riducenti. Per l' α -amilasi e l' α -glucosidasi i cambiamenti che intervengono nei loro patterns isoenzimatici non si sono dimostrati strettamente correlati con le variazioni delle loro attività specifiche. Le curve di attività di entrambi gli enzimi hanno dimostrato un andamento piuttosto parallelo e un massimo a sei settimane dall' invecchiamento. I livelli di attività di α -amilasi e quelli di α -glucosidasi sono discussi con riferimento ai dati esistenti in letteratura sul contenuto d'amido nella uva.

Bibliografia

- ARNOLD, W. N., 1965: β -Fructofuranosidase from grape berries. *Biochim. Biophys. Acta* 110, 134—147.
- DAL BELIN PERUFFO, A. and PALLAVICINI, C., 1975: Enzymatic changes associated with ripening of grape berries. *J. Sci. Food Agric.* 26, 559—566.
- — —, RENOSTO, F. and PALLAVICINI, C., 1978: α -Glucosidase from grape berries: partial purification and characterization. *Planta* 142, 195—201.
- DOWNTON, W. J. S. and HAWKER, J. S., 1973: Enzymes of starch metabolism in leaves and berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, 12, 1557—1563.
- GABRIEL, O., 1971: Locating enzymes on gels. In: COLOWICK, S. P. and KAPLAN, N. O. (Eds.): *Methods in enzymology*, Vol. XXII, 578—604. Academic Press, New York and London.
- HAWKER, J. S., 1969: Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry* 8, 9—17.
- LLOYD, J. B. and WHELAN, W. J., 1969: An improved method for enzymic determination of glucose in the presence of maltose. *Anal. Biochem.* 30, 467—469.
- MANNERS, D. J., 1974: Some aspects of the enzymic degradation of starch. In: PRIDHAM, J. B. (Ed.): *Plant carbohydrate biochemistry*, 109—125. Academic Press, London and New York.
- ONCKELN, H. A., VAN et VERBEEK, R., 1969: La formation des isozymes de l' α -amylase durant la germination de l'orge. *Planta* 88, 255—260.
- PINSKY, A., SPORN, J., GROSSMAN, S. and RIVLIN, M., 1973: Lipoxigenase isoenzymes from *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 12, 1051—1055.
- SACHER J. A., HATCH, M. D. and GLASZIOU, K. T., 1963: Sugar accumulation cycle in sugar cane. III. Physical and metabolic aspects of cycle in immature storage tissues. *Plant Physiol.* 38, 348—354.

- SNELL, F. D. and SNELL, C. T., 1970: Colorimetric methods of analysis, Vol. IV AA, 1—72. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- SWIFT, J. G., BUTTROSE, M. S. and POSSINGHAM, J. V., 1973: Stomata and starch in grape berries. *Vitis* 12, 38—45.
- WESTON, G. D. and CHIN, C. K., 1975: The effect of sucrose on the synthesis of invertase isozymes in excised roots of tomato. *Plant Science Letters* 4, 31—34.
- WILSON, A. M., 1971: Amylase synthesis and stability in crested wheatgrass seeds at low water potentials. *Plant Physiol.* 48, 541—546.

Eingegangen am 23. I. 1979

Dr. A. DAL BELIN PERUFFO
Dr. C. PALLAVICINI
Istituto di Chimica Agraria
e Industrie Agrarie
dell'Università di Padova
Via Gradenigo, 6
35100 — Padova
Italia