

Stazione Enologica Sperimentale, Asti (Italia)

Gli enzimi pectolitici del mosto

di

L. USSEGLIO-TOMASSET e C. TARANTOLA

Le pectine sono costituite da polimeri dell'acido d-galatturonico aventi i gruppi carbossilici in parte liberi ed in parte esterificati con alcool metilico.

I carbossili esterificati rappresentano oltre il 50 % dei carbossili totali; la solubilità delle pectine in acqua diminuisce con l'aumentare del peso molecolare e del numero dei carbossili liberi.

In natura esistono due enzimi che concorrono a demolire le pectine: la pectinmetilesterasi (PME), che libera per idrolisi alcool metilico dai carbossili esterificati e la poligalatturonasi (PG), che scinde idroliticamente i legami glucosidici esistenti nella catena poligalatturonica.

E' dubbio se esista una protopectinasi che libera le pectine dalle loro combinazioni con cellulosa ed emicellulose (protopectine) o se questa azione sia svolta dalla stessa poligalatturonasi.

La PME è presente nelle varie parti di molte piante superiori; è anche prodotta da diversi microorganismi; a seconda dell'origine il pH ottimo d'azione è compreso tra 4,5 e 7,5.

La PG è stata rilevata in alcune piante superiori, ma assai meno diffusa della PME; è prodotta invece da molte specie di ifomiceti ed anche da lieviti e batteri. Secondo recenti studi l'azione idrolizzante sui legami glucosidici della molecola pectica spetterebbe non ad un solo enzima, ma a diverse poligalatturonasi.

Per quanto riguarda i frutti la presenza della PME è stata rilevata negli agrumi, che ne sono particolarmente ricchi, specialmente l'albedo ed il flavedo, come pure nei pomodori, nelle mele e nelle pere.

Non altrettanto sicura è la presenza nei frutti sani della PG: i dubbi sono determinati principalmente dalla mancanza di un sicuro metodo analitico che permetta di misurare l'attività di questo enzima. Infatti i metodi viscosimetrici, per lo più impiegati, sono influenzati da troppi fattori per essere sicuramente attendibili.

Mentre numerose sono state le indagini sulla presenza e l'attività degli enzimi pectolitici nei frutti in genere, scarsi sono gli studi riguardanti le uve ed i mosti.

L'interesse degli enologi si è piuttosto polarizzato sull'impiego nella vinificazione di preparati enzimatici ottenuti da microorganismi.

Sulla presenza nei mosti della PME non vi sono dubbi: FRANCOT e GEOFFROY (1956), FLANZY e LOISEL (1958), FLANZY e BOUZIGUES (1959), hanno rilevato un sensibile incremento del tenore in metanolo in mosti lasciati macerare a bassa temperatura in presenza delle parti solide. Da un recente studio di MARTEAU, SCHEUR e OLIVIERI (1961) risulta poi che in 24 — 48 ore tutti i gruppi — OCH_3 delle pectine presenti nei mosti vengono saponificati per opera della PME proveniente dall'uva.

Per quanto concerne la PG, non ne è stata a tutt'oggi sicuramente dimostrata la presenza nelle uve; si presume che questo enzima vi si trovi in

quanto i mosti, lasciati a sè dopo la spremitura delle uve a temperatura sufficientemente bassa per inibire la fermentazione, subiscono una spontanea defecazione. Questo fenomeno potrebbe tuttavia esser dovuto anzichè all'azione combinata della PME e della PG, all'azione della sola PME, dalla quale si originano acidi poligalatturonici (acido pectico), precipitabili per opera del calcio, sempre presente nei mosti.

Scopo del presente lavoro è di valutare l'attività pectolitica naturale del mosto, quale si ottiene nelle condizioni pratiche di cantina.

In tutta una serie di ricerche sui colloidali dei mosti e dei vini uno di noi (USSEGLIO-TOMASSET L., 1958a, b, 1959a, 1961) ha seguito in particolare l'evoluzione delle pectine, servendosi dell'esame elettroforetico in fase libera dei colloidali secondo Tiselius.

Il metodo elettroforetico, per i dettagli del quale rimandiamo ai lavori citati ed alla letteratura specializzata, consente una caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei diversi costituenti colloidali e permette di mettere in evidenza modificazioni di struttura diversamente non rilevabili.

Sempre uno di noi in un recente lavoro*) e sempre servendosi del metodo elettroforetico, ha precisato le cause della rapida scomparsa delle pectine dal mosto, scomparsa che avviene in breve tempo (24 h) e che è imputabile all'attività enzimatica naturale del mosto e non a quella dei blastomiceti dell'uva, come si era erroneamente ritenuto.

Giunti a questo punto ci è parso opportuno rivolgere l'attenzione non tanto alle pectine del mosto, quanto all'azione degli enzimi pectolitici del mosto stesso. A tale scopo, resi edotti dalle precedenti esperienze che i fenomeni a carico delle pectine si esauriscono nel mosto durante le prime 24 h dalla spremitura dell'uva, abbiamo voluto seguire l'evoluzione delle sostanze pectiche esaminando il campione in studio ogni ora per un periodo di 10 h dalla spremitura; un ulteriore esame è stato compiuto dopo 24 h.

Ci siamo serviti di uva Barbera della vendemmia 1961, proveniente dal vigneto sperimentale di questa Stazione, sana ed accuratamente scelta. Dato l'andamento meteorologico eccezionale dell'annata suddetta, l'uva impiegata è risultata particolarmente integra ed esente da attacchi di ifomiceti.

L'uva è stata ammostata alla pigiatrice-diraspatrice, il mosto ottenuto è stato sgrondato attraverso cesti di vimini in modo da eliminare bucce e vinaccioli ed è stato aggiunto per il 10 % del primo torchiato ricavato mediante torchiatura a bassa pressione.

Il liquido torbido ottenuto ha presentato un pH di 3,15.

Le indagini sull'attività pectolitica naturale del mosto sono state condotte operando:

1. sul mosto a temperatura di 21,5° C;
2. sul mosto aggiunto di pectina da mela a temperatura di 21,5° C;
3. sullo stesso mosto aggiunto di pectina e mantenuto in armadio frigorifero.

A questo scopo si è proceduto nel modo seguente:

1. In 12 matracci di vetro da 5 litri si sono introdotti ml 500 di mosto per ciascuno e in altrettanti matracci da distillazione si sono introdotti ml 100 del medesimo mosto.

Immediatamente si è effettuata la precipitazione dei colloidali nel primo

*) USSEGLIO-TOMASSET L., L'attività pectolitica del mosto d'uva. Ann. Sper. Agr. (in corso di pubblicazione)

recipiente, contenente 500 ml di mosto, aggiungendo il 5 % in volume di HCl 1 : 1 e ml 2500 di alcool etilico al 96 %; contemporaneamente si è sottoposto a distillazione il primo matraccio, contenente ml 100 di mosto, per la determinazione dell'alcool metilico. I restanti recipienti sono stati conservati alla temperatura di 21,5° C.

2. 5 litri di mosto si sono aggiunti immediatamente dopo la spremitura di ml 1000 di una soluzione al 0,75 % di pectina da mela (UNIPECTIN) previamente preparata ed il cui tenore in colloidali totali era stato in precedenza determinato per pesata del residuo di un'aliquota nota, tirata a secco su b.m. e seccata in stufa a 105° C. La percentuale di p e c t i n a p u r a è stata determinata per via elettroforetica (USSEGLIO-TOMASSET 1959b).

Il mosto aggiunto di pectina è stato distribuito in due serie di 12 matracci in ragione di ml 120 ciascuno.

Immediatamente il primo matraccio di una serie è stato aggiunto del 5 % in volume di HCl 1 : 1 e di ml 600 di alcool etilico al 96 % per la precipitazione dei colloidali; contemporaneamente si è sottoposto a distillazione per la determinazione dell'alcool metilico il primo matraccio della seconda serie. I restanti recipienti sono stati conservati alla temperatura di 21,5° C.

3. Due serie di 11 matracci contenenti ciascuno ml 120 di mosto aggiunto di pectina sono state portate in armadio frigorifero; uno dei recipienti con un termometro immerso ha mostrato dopo 24 h la temperatura di 13° C; tuttavia, non trattandosi di un termostato ed il liquido non essendo stato refrigerato rapidamente, la temperatura di 13° C non rappresenta le reali condizioni termiche subite dai campioni.

Allo scadere di ogni ora si sono sottoposti a distillazione per la determinazione dell'alcool metilico ml 100 di mosto tal quale conservato a 21,5° C, ml 120 di mosto aggiunto di pectina conservato a 21,5° C, ml 120 di mosto aggiunto di pectina conservato in frigorifero; contemporaneamente si sono precipitati i colloidali con alcool da ml 500 di mosto tal quale conservato a temperatura di 21,5° C, ml 120 di mosto aggiunto di pectina conservato a temperatura di 21,5° C, ml 120 di mosto aggiunto di pectina conservato in frigorifero.

Abbiamo dunque seguito l'incremento dell'alcool metilico nel mosto tal quale, nel mosto aggiunto di pectina da mela e conservato a temperatura ambiente e nel mosto aggiunto di pectina da mela e conservato in frigorifero: i campioni sono stati esaminati ogni ora per un periodo di 10 h e infine dopo 24 h dalla spremitura del mosto. Isolandoli dopo i medesimi intervalli di tempo, abbiamo inoltre ottenuto tre serie di precipitati colloidali i quali, liberati dall'alcool acido per centrifugazione e purificati opportunamente come sarà in seguito dettagliatamente descritto, sono stati sottoposti ad esame elettroforetico.

Per due vie abbiamo quindi seguito le modificazioni apportate alle pectine dagli enzimi del mosto, e cioè mediante:

a) la determinazione periodica dell'alcool metilico liberatosi, che ci illumina sull'attività della PME;

b) il periodico esame elettroforetico dei colloidali, il quale ci consente di indagare sulle modificazioni subite dalle pectine ad opera di tutti i fattori che ne influenzano le caratteristiche qualitative e quantitative.

La pectinmetilesterasi del mosto

Come è già stato in precedenza illustrato la presenza e l'attività della PME nei frutti integri è stata dimostrata da diversi AA.

In particolare MARTEAU, SCHEUR e OLIVIERI (1961) hanno recentemente studiato l'azione della PME del mosto, valutando la liberazione del metanolo nel tempo. Tuttavia dobbiamo esprimere qualche riserva sui dati forniti da questi AA. Essi (forse a causa del metodo impiegato nella determinazione del metanolo influenzato, può darsi, da tracce di sostanze diverse dall'alcool metilico) trovano infatti una quantità di 20 mg/l di metanolo sul mosto appena spremuto, mentre noi riscontriamo nel mosto appena spremuto soltanto 1 mg/l di alcool metilico.

Ora, se si riflette che 20 mg/l di metanolo corrispondono a 0,148 g/l di pectina esterificata per l'80 ‰ e se si riflette ancora che il mosto è povero in pectina, tanto che il tenore sopra indicato rappresenta la totalità delle pectine per un gran numero di mosti e supera la metà del tenore in pectine per la maggior parte, si dovrebbe concludere che la metà (o almeno un terzo) delle pectine presenti vengano idrolizzate istantaneamente, mentre l'idrolisi della parte restante avviene in modo relativamente lento.

E' possibile seguire nel mosto l'azione della PME solamente se si ha a disposizione un metodo sufficientemente sensibile e preciso per la determinazione dell'alcool metilico. Noi abbiamo adottato il metodo messo a punto da UINO e SALO (1960) che presenta una buona riproducibilità ed un'ottima sensibilità. Si tratta della determinazione colorimetrica a mezzo dell'acido cromotropico della formaldeide ottenuta per ossidazione con permanganato in mezzo fosforico a titolo controllato ed in presenza di alcool etilico: 100 mg/l rappresentano il limite superiore della curva di taratura, compresa appunto tra 0 e 100 mg/l.

Noi abbiamo impiegato il metodo esattamente come descritto dagli AA. effettuando le misure con lo spettrofotometro Beckmann DU.

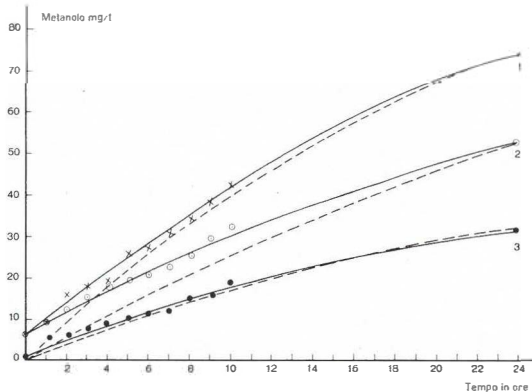


Fig. 1: Attività della pectinmetilesterasi del mosto (pH = 3,15)
 — Interpolazione grafica dei dati sperimentali; ---- Curva teorica della reazione monomolecolare. 1: Mosto aggiunto di pectina da mela a 21,5° C; 2: Mosto aggiunto di pectina da mela a 13° C; 3: Mosto tal quale a 21,5° C

I risultati delle determinazioni dell'alcool metilico nelle serie di campioni in studio sono riportati nella tabella 1 ed espressi graficamente nel diagramma della fig. 1.

I dati meritano un attento esame in quanto ci forniscono gli elementi per stabilire la cinetica della demetossilazione delle pectine.

Tabella 1

	Mosto tal quale t = 21,5° C mg/l	Mosto aggiunto di pectina	
		t = 21,5° C mg/l	t = 13° C mg/l
Metanolo al tempo 0	1,0	6,0	6,0
" dopo 1 h	5,0	9,0	9,0
" " 2 "	6,0	15,5	12,5
" " 3 "	7,5	17,5	14,5
" " 4 "	8,5	19,0	17,5
" " 5 "	10,0	25,5	19,5
" " 6 "	11,0	27,5	21,0
" " 7 "	12,0	30,5	22,5
" " 8 "	15,0	34,0	25,5
" " 9 "	15,5	38,0	29,5
" " 10 "	19,0	42,5	32,5
" " 24 "	32,5	75,5	53,0

Cinetica della reazione di demetossilazione

SOLMS e DEUEL (1954) hanno tentato di definire il meccanismo di scissione enzimatica dei gruppi esterificati delle pectine. Gli AA. si sono serviti di un preparato enzimatico ricavato dalle arance ed opportunamente purificato e ne hanno studiato l'azione su soluzioni di pectina a diverso grado di esterificazione, ottenute per parziale saponificazione alcalina di pectine completamente metilate con diazometano. Gli AA. citati concludono che l'idrolisi enzimatica delle pectine non può essere caratterizzata da una reazione di ordine definito, l'andamento della reazione essendo influenzato dal grado di esterificazione della pectina in esame.

Noi, esaminando l'evoluzione del metanolo nel mosto tal quale e nel mosto aggiunto di pectina da mela, senza separazione dell'enzima e senza alcuna modificazione chimica delle pectine presenti od aggiunte, abbiamo osservato che la reazione enzimatica di demetossilazione ha un andamento caratteristico e definito, come risulta da quanto segue.

Dopo l'osservazione preliminare che l'enzima del mosto agisce sia sulle pectine del mosto che su quelle di mela aggiunte, passiamo ad esaminare per primo il caso del mosto aggiunto di pectina di mela e conservato a 21,5° C.

1. Mosto aggiunto di pectina di mela e conservato a 21,5° C.

Abbiamo eseguito una saponificazione a freddo per 24 h aggiungendo 20 ml di NaOH N/10 a 20 ml della soluzione di pectina da mela al 0,75 % che abbiamo

impiegato nelle nostre prove per arricchire il mosto in pectina; dopo acidificazione abbiamo portato il volume a circa ml 100 e distillato oltre 3/4 del liquido, raccogliendolo in matraccio tarato da ml 100; previa aggiunta dell'alcool etilico necessario, abbiamo portato a volume e quindi eseguito la determinazione dell'alcool metilico. Abbiamo così stabilito che la quantità di metanolo che si libera per idrolisi completa delle pectine da mela aggiunta al nostro mosto è, riferita ad un litro di mosto originale impiegato, di 97,5 mg. Possiamo ora considerare che il metanolo liberato dopo 24 h nel mosto tal quale sia rappresentativo del tenore totale di pectina presente: dato il piccolo contenuto in pectina dei mosti in genere e del mosto in esame in particolare, non commetteremo un errore notevole ai fini dello studio cinetico della demetossilazione.

Avremo pertanto 32,5 mg/l di metanolo dovuto alla pectina naturale del mosto e 97,5 mg/l di metanolo dovuto alla pectina da mela aggiunta: in totale l'idrolisi completa della pectina presente libera $32,5 + 97,5 = 130$ mg/l di alcool metilico.

Interpolando tra i dati sperimentali abbiamo ottenuto la curva a tratto pieno del diagramma della fig. 1, la quale ci consente di conoscere il tempo che corrisponde ad una data percentuale di metanolo liberato rispetto al totale. In base al diagramma si ha:

il 25 % dell'alcool metilico viene liberato in 7,4 ore
 il 33 % " " " " " " " 10,3 "
 il 50 % " " " " " " " 18,5 "

Indichiamo con $t_{1/4}$, $t_{1/3}$, $t_{1/2}$ rispettivamente i tempi sopra indicati.

I rapporti tra i tempi necessari a trasformare percentuali determinate di una sostanza sono caratteristici e diversi a seconda che si tratti di una reazione del primo, secondo, terzo ordine; precisamente si hanno i valori seguenti:

Ordine della reazione	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$
	$t_{1/4}$	$t_{1/3}$
1	2,41	1,71
2	3,00	2,00
3	3,86	2,40

Ora, se calcoliamo i rapporti suddetti nel nostro caso specifico, otteniamo:

$$\frac{t_{1/2}}{t_{1/4}} = 2,50 \qquad \frac{t_{1/2}}{t_{1/3}} = 1,79$$

Si può dunque concludere che l'idrolisi della pectina ad opera della PME del mosto segue con buona approssimazione l'andamento di una reazione del primo ordine.

Nel nostro caso particolare possiamo anche calcolare il valore della costante di reazione $K_{21,5^\circ}$ alla temperatura di $21,5^\circ$ C, applicando la formula:

$$K = \frac{2,3026}{t} \lg \frac{C_0}{C}$$

Sceghieremo i valori del tempo e della concentrazione corrispondenti al tempo massimo nelle nostre determinazioni (24 h); infatti gli errori relativi si riducono così al minimo:

$$K_{21,5^\circ} = \frac{2,3026}{86.400} \lg \frac{130}{54,5} = 1,0061 \times 10^{-5}$$

Possiamo ora a mezzo della costante di reazione calcolare il tempo necessario per la scissione idrolitica del 80 %, 90 %, 95 % rispettivamente dei carbossili inizialmente esterificati.

Il calcolo fornisce i valori seguenti:

% di metanolo liberato	tempo necessario in ore
58,08	24
80	44,4
90	63,6
95	82,7

In base alla costante di reazione è possibile ancora tracciare la curva teorica dell'idrolisi: essa è riportata a trattini sul diagramma della fig. 1 e presenta un ottimo accordo con i dati sperimentali.

2. Mosto tal quale conservato a 21,5° C.

Poichè in una reazione monomolecolare l'andamento dipende soltanto dalla costante di reazione e dalla concentrazione iniziale del substrato, potremo tracciare la curva teorica che esprime l'andamento dell'idrolisi nel tempo, in base alla costante precedentemente calcolata e tenendo presente che il metanolo riscontrato dopo 24 h va considerato, come risulta dai dati sopra riportati, solamente il 58,08 % di quello ad idrolisi completa.

La curva ottenuta è riportata nel diagramma di fig. 1 disegnata a trattini e presenta una concordanza con i dati sperimentali davvero eccellente.

3. Mosto aggiunto di pectina e conservato in frigorifero.

Come abbiamo in precedenza osservato, i campioni conservati in frigorifero non si possono considerare mantenuti alla temperatura finale di 13° C per tutta la durata dell'esperienza; tuttavia, applicando l'equazione delle reazioni monomolecolari in corrispondenza al tempo massimo (24 h), si commetterà l'errore minore e si otterranno dei dati abbastanza approssimati ed utili per valutare l'influenza della temperatura sull'andamento della reazione.

Calcoliamo dunque la costante K_{13} a 13° C mediante la formula:

$$K_{13} = \frac{2,3026}{86.400} \lg \frac{130}{77} = 6,0616 \times 10^{-6}$$

A mezzo della costante ora ottenuta si può tracciare la curva teorica dell'idrolisi a 13° C, la quale, come risulta dal diagramma e come era prevedibile, è quella che si discosta maggiormente dai dati sperimentali.

Influenza della temperatura sulla velocità di reazione

La relazione intercorrente tra la costante di velocità di reazione e la temperatura è data dall'equazione di ARRHENIUS:

$$\lg K = \lg b + \frac{1}{2} \lg T - \frac{W}{4,573 T} \quad \text{dove:}$$

T = temperatura assoluta
 K = costante di velocità di reazione
 b = costante d'azione o fattore mediale
 W = energia critica o energia di attivazione.

Conoscendo due valori della costante e le due temperature corrispondenti è possibile calcolare i valori di b e W e quindi il valore di K ad una temperatura qualsiasi.

Nel nostro caso utilizzando le costanti ricavate a 21,5° C e a 13° C, si ottiene dal calcolo:

$$\begin{aligned} \lg b &= 2,25189 & b &= 178,6 \\ W &= 11.431,5 \end{aligned}$$

Possiamo ora calcolare il valore della costante di reazione a 23° C.

Il calcolo fornisce il risultato seguente: $K_{23}^{\circ} = 1,1139 \times 10^{-5}$.

Esprimeremo quindi l'influenza della temperatura a mezzo del coefficiente di temperatura Q_{10} :

$$Q_{10} = \frac{K_{23}^{\circ}}{K_{13}^{\circ}} = 1,84$$

Riassumendo, l'idrolisi delle pectine ad opera della PME del mosto si presenta come una reazione monomolecolare quando si esprima la concentrazione del substrato in meq/l di carbossile esterificato; il coefficiente di temperatura Q_{10} della reazione è inferiore a 2 e si aggira intorno al valore 1,8.

Espressione dell'attività della PME

Il fatto che l'azione della PME del mosto sia rappresentabile come una reazione monomolecolare è di notevole importanza perchè permette di esprimere in modo preciso e semplice l'attività enzimatica di un mosto con il valore della costante di reazione.

Infatti le reazioni enzimatiche sono monomolecolari quando è lenta la velocità di combinazione dell'enzima con il substrato e molto rapida la decomposizione del complesso che ne risulta.

Dette V , C_s e C_e rispettivamente la velocità di reazione, la concentrazione del substrato e la concentrazione dell'enzima si può scrivere:

$$V = K' \cdot C_e \cdot C_s$$

Ora poichè nel nostro caso la concentrazione dell'enzima rimane costante, si ha: $K = K' C_e$.

La costante di reazione è dunque funzione della carica enzimatica ed il suo valore ad una determinata temperatura è espressione dell'attività enzimatica del mezzo.

L'attività della PME si può dunque determinare nel modo seguente:

ml 100 di mosto appena spremuto, eventualmente arricchito in pectine, si neutralizzano con NaOH concentrato, quindi si aggiungono 5 ml di NaOH N/1. Si riscalda rapidamente a 25° C e si pone in termostato alla stessa temperatura. Contemporaneamente si portano a 25° C e si pongono in termostato ml 100 del medesimo mosto non alcalinizzato. Dopo 24 ore di permanenza in termostato si sottopongono alla distillazione i campioni, previa acidificazione con ml 10 di H₂SO₄ N/1 della prova alcalinizzata con soda. Si raccolgono circa ml 75 di distillato in matraccio tarato da ml 100 e quindi si procede alla determinazione dell'alcool metilico nei due campioni in esame.

Dette A e a rispettivamente le quantità di alcool metilico del campione saponificato con soda e di quello sottoposto all'azione enzimatica, espresse in mg/l, l'attività pectinmetilesterasica del mosto in esame si ottiene dall'equazione seguente:

$$K_{25^\circ} = \frac{2,3026}{86.400} \lg \frac{A}{A - a}$$

Il valore della costante ottenuta esprime quantitativamente l'attività enzimatica del mezzo e consente un confronto tra le attività di mezzi diversi: ci proponiamo con la prossima vendemmia di raccogliere una serie di dati sull'attività pectinmetilesterasica dei mosti, esaminando campioni di diversa qualità e provenienza.

Esame elettroforetico dell'attività pectolitica del mosto

L'esame elettroforetico dei colloidi è stato compiuto sui precipitati ottenuti con alcool previa acidificazione, come abbiamo precedentemente descritto.

Il precipitato è stato separato dall'alcool acido per centrifugazione, quindi lavato ripetutamente per centrifugazione con alcool neutro. Dopo allontanamento dell'alcool il precipitato è stato estratto con ml 50 di acqua distillata calda, si è allontanato centrifugando il deposito indisciolto, la soluzione torbida si è posta a riscaldare su bagno d'acqua e quindi si è impiegata nuovamente per estrarre il deposito: questa operazione si è ripetuta per tre volte. Il deposito indisciolto è stato trattato con altri 50 ml di acqua distillata calda e riestratto per due volte con il medesimo liquido; infine si è rinnovata per la terza volta l'acqua distillata e si sono ripetute le estrazioni. I liquidi riuniti sono stati concentrati su bagno d'acqua a circa ml 50 e la soluzione trasportata in un cilindro a tappo smerigliato è stata aggiunta di 5 volte il suo volume di alcool neutro. Il precipitato ottenuto è stato separato per centrifugazione e disciolto in un piccolo volume di acqua distillata; la soluzione è stata sottoposta a centri-

fugazione per 30' a 4.000 giri al minuto: in questo modo si separa un fine deposito scuro di sostanze insolubili e polifenoli ossidati e si ottiene una soluzione limpida, di colore ambrato, che presenta una buona trasparenza alla luce nello spessore che raggiungerà all'interno della cella elettroforetica.

ml 5 della soluzione colloidale purificata si sono introdotti in un apposito sacchetto di cellophane e sono stati posti in dialisi contro un volume circa 60 volte maggiore di tampone, costituito da acido cacodilico e cacodilato sodico di forza ionica 0,1 e di pH 6,2 (acido cacodilico 10,935 g/l, cacodilato sodico triidrato 21,402 g/l).

Dopo 24 h di dialisi si è rinnovato il tampone e, trascorse altre 24 h, si è ottenuto il liquido pronto per l'elettroforesi.

Un'aliquota di soluzione colloidale purificata è stata tirata a secco su bagno d'acqua in capsula tarata e seccata in stufa a 105° C: si è ottenuta così per pesata la quantità di colloidali totali.

Su un'altra aliquota di soluzione colloidale purificata si è eseguita la determinazione alcalimetrica delle pectine secondo PEYNAUD (1952).

L'esame elettroforetico in fase libera è stato effettuato con l'apparecchio modello 38 A della Perkin-Elmer Corp.

Abbiamo eseguito una serie periodica di analisi elettroforetiche dei colloidali naturali del mosto e di pectine di altra natura (da mela) aggiunte al mosto, essenzialmente per due motivi:

1. sperimentare se fosse possibile osservare un'azione poligalatturonasica da parte del mosto sulle pectine in esso contenute: ogni componente elettroforetico è svelabile in un picco visibile e fotografabile; pertanto se ad un certo momento l'elettroferogramma presenta un numero di componenti ad elevata mobilità (pectine) superiore a quello del mosto appena spremuto, ciò significa che la catena poligalatturonica delle pectine è stata rotta, dando origine a componenti a mobilità diversa.

Mediante l'elettroforesi le pectine si possono osservare e seguire individualmente nel tempo, registrandone le modificazioni qualitative e quantitative. Specialmente a causa del loro piccolo tenore nel mosto, nessun altro metodo (viscosimetrico, ecc.) si presta efficacemente allo scopo. Vogliamo sottolineare che si presenta qui il problema non tanto di eseguire un dosamento delle pectine in presenza di altri colloidali, ma di poter notare differenze tra pectine diverse soltanto per il peso molecolare, differenze non valutabili con metodi che si riferiscono alla loro costituzione chimica;

2. osservare se un'eventuale attività poligalatturonasica del mosto si manifestasse in modo specifico soltanto sulle pectine provenienti dall'uva oppure anche su pectine di provenienza diversa.

L'analisi elettroforetica dei colloidali naturali del mosto

La tabella 2 riporta le mobilità dei componenti elettroforetici ottenute dall'esame dei colloidali naturali del mosto conservato a 21,5° C: le mobilità sono state calcolate in corrispondenza ad un tempo di elettroforesi di circa 6.000".

I dati della tabella 2 meritano un attento esame.

Dopo pochi minuti di elettroforesi in tutti i casi la miscela di colloidali in esame si divide in due gruppi: un gruppo di colloidali ad elevata mobilità, le pectine, si stacca nettamente da un gruppo a bassa mobilità (galattani, pentosani, ecc.).

Tabella 2
 Mobilità elettroforetiche $\times 10^5$ ($\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) dei componenti del
 mosto tal quale mantenuto a $21,5^\circ \text{C}$
 Ramo ascendente
 Tampone: HCac - NaCac; pH = 6,2; $\mu = 0,1$ (pH del mosto = 3,15)

	u_1	u_2	u_3	u_4	u_5
Al tempo 0	+ 0,56	- 1,54			- 4,97
Dopo 1 h	+ 0,52	- 1,56			- 4,96
" 2 "	+ 0,41	- 1,57			- 5,16
" 3 "	+ 0,75	- 1,61		- 4,76	- 5,78
" 4 "	+ 0,52	- 1,53		- 4,72	- 6,11
" 5 "	+ 0,66	- 1,56		- 4,52	- 6,61
" 6 "	+ 0,60	- 0,40	- 1,41		- 6,32
" 8 "	+ 0,49	- 0,57	- 1,45	- 4,42	- 6,78
" 9 "	+ 0,70	- 0,46	- 1,55	- 4,18	- 7,05
" 10 "	+ 0,46	- 0,28	- 1,44	- 4,17	- 7,04
" 24 "	+ 0,52				- 8,28

La visione diretta degli elettroferogrammi più oltre riportati, illustra chiaramente la separazione dei due gruppi di colloidi.

Prolungando il tempo di elettroforesi il gruppo di colloidi a bassa mobilità si risolve in più componenti (al massimo 3) i quali non si separano tuttavia nettamente tra loro: si nota un componente a leggera mobilità positiva, un componente a leggera mobilità negativa e un componente a mobilità negativa non superiore a $1,6 \times 10^{-5}$.

Con il procedere dell'elettroforesi le pectine si staccano sempre più dagli altri colloidi.

Dalla tabella 2 si osserva che il mosto appena spremuto presenta un solo componente ad elevata mobilità e tale componente si mantiene unico sino alla fine dell'elettroforesi, dopo un tempo di 6.060".

I colloidi precipitati dal mosto dopo 1 e 2 h presentano il medesimo quadro elettroforetico: unico componente ad elevata mobilità dopo 6.450" e 6.420" rispettivamente.

Dopo 2 h dalla spremitura, le pectine naturali del mosto da noi esaminato si presentano sotto forma di un solo componente, sufficientemente omogeneo da non essere scindibile per mezzo dell'elettroforesi nelle condizioni sperimentali adottate.

Tuttavia a 3 h dalla spremitura le pectine del mosto appaiono scisse in due componenti di mobilità elevata, ma diversa, tanto da comparire in due picchi distinti: dopo un tempo di elettroforesi di 1.740" i due componenti costituenti le pectine sono nettamente separati (si osservi la serie di elettroferogrammi che illustrano l'andamento del fenomeno).

Dopo la 3^a h le pectine si presentano costantemente in due componenti, tranne che nel mosto esaminato dopo 6 h dalla spremitura e in quello a 24 h dalla spremitura.

Tabella 3
Concentrazione dei componenti del mosto tal quale conservato a 21,5° C

	Col- loidi totali g/l	Pectine per via chimica		Percentuale dei colloidi per via elettroforetica			
		g/l	‰ dei colloidi totali	Altri colloidi ‰	Pectine		
					Compo- nente più lento ‰	Compo- nente più mobile ‰	Pectine totali ‰
Al tempo 0	0,480	0,240	50,0	40,9		59,1	59,1
Dopo 1 h	0,340	0,138	40,6	52,8		47,2	47,2
„ 2 „	0,262	0,119	45,4	52,3		47,7	47,7
„ 3 „	0,294	0,161	54,8	51,0	14,6	34,4	49,0
„ 4 „	0,262	0,111	42,4	51,9	9,7	38,4	48,1
„ 5 „	0,274	0,160	58,4	53,1	4,8	42,1	46,9
„ 6 „	0,237	0,117	49,4	61,3		38,7	38,7
„ 8 „	0,230	0,105	45,6	53,9	6,8	39,3	46,1
„ 9 „	0,257	0,161	62,6	54,2	5,3	40,5	45,8
„ 10 „	0,218	0,094	43,1	57,3	4,8	37,9	42,7
„ 24 „	0,186	0,055	29,6	81,7			18,3

I rapporti quantitativi tra i componenti le pectine e il loro tenore complessivo subiscono notevoli variazioni che saranno illustrate in seguito; nel mosto esaminato a 24 h dalla spremitura le pectine sono quasi scomparse.

In tutti i casi si nota lo sdoppiamento delle pectine dopo un tempo di elettroforesi inferiore a 2.400".

Si deve ancora osservare che dei due componenti le pectine del mosto quello più veloce e quantitativamente più importante aumenta progressivamente la mobilità elettroforetica con il passare del tempo, mentre il componente più lento presenta una lieve diminuzione della mobilità.

I fatti sperimentali descritti dimostrano l'intervento di una poligalatturonasi, la quale, spezzando la catena del polimero, dà origine a componenti di diversa grandezza molecolare e quindi di diversa mobilità, differenziabili per mezzo dell'elettroforesi.

Sull'andamento della mobilità delle pectine nel tempo influiscono due fattori: l'aumento del numero delle cariche elettriche a causa dei carbossili resi liberi dall'attività della PME e la diminuzione della grandezza molecolare ad opera della PG.

La leggera diminuzione di mobilità del componente pectico meno mobile potrebbe essere soltanto apparente; infatti, come si vedrà in seguito, la sua percentuale relativa diminuisce costantemente per la formazione di frazioni più mobili che vengono comprese nel picco più veloce, il quale ha subito una notevole diffusione; il massimo corrispondente alle frazioni più lente può così presentare dei lievi spostamenti rispetto alle precedenti determinazioni.

Nella tabella 3 sono riportati i valori che illustrano l'andamento relativo nel tempo delle concentrazioni dei diversi componenti colloidali.

Si osserva una progressiva diminuzione del tenore in colloidi totali.

Si nota una più marcata caduta di concentrazione dopo 1 h, causata essenzialmente dalla diminuzione delle pectine; in seguito la diminuzione dei colloidi totali è più lenta e la percentuale delle pectine presenta una leggera diminuzione fino a 10 h dopo la spremitura del mosto, mentre a 24 h dalla spremitura si ha una netta caduta del valore delle pectine.

Osserviamo come i valori delle pectine determinate per via chimica abbiano un andamento meno regolare: data la scarsa quantità di pectine presenti, piccole inesattezze nella neutralizzazione dei liquidi di estrazione sono causa di errori notevoli.

Come si vede dalla tabella 3, dopo 3 h dalla spremitura le pectine sono scisse in due componenti uno più veloce che rappresenta il 70 % delle pectine totali ed uno più lento che ne rappresenta il 30 %; nelle ore successive, mentre la quantità di pectine totali rimane pressochè costante, la proporzione del componente più lento passa dal 30 % al 10,2 %: si osserva dunque un'azione di depolimerizzazione del componente più lento.

Alla 6^a h si nota la scomparsa del componente pectico più lento, componente che riappare nelle ore successive, diminuendo con il passare del tempo.

L'andamento della concentrazione del componente pectico più lento, il fatto che la sua mobilità diminuisca leggermente nel tempo e la percentuale complessiva delle pectine rimanga quasi costante, fanno pensare ad un'azione protopectinasi a carico delle pectine insolubili del mosto, con solubilizzazione di piccole quantità di pectine ad elevato peso molecolare: all'attività della protopectinasi si sovrappone quella della PG che demolisce il componente più lento, arricchendo con il prodotto di scissione idrolitica la concentrazione del componente più veloce.

A 24 h dalla spremitura la quantità totale di pectine è ridotta al 12 % circa del tenore in pectine del mosto appena spremuto.

Da quanto sopra esposto, ci sembra di poter affermare che la presenza della PG nel mosto d'uva sia suffragata da dati sperimentali significativi e convincenti: scissione di un unico componente pectico in due, diminuzione progressiva della concentrazione del componente a mobilità elettroforetica più bassa ed aumento corrispondente del componente a mobilità elettroforetica più elevata.

I dati sperimentali si pronunciano pure a favore della presenza di una protopectinasi nel mosto; tuttavia, poichè l'entità delle pectine solubili che compaiono ad un certo momento (8^a h) è piccola e poichè la contemporanea presenza della PG complica l'andamento del fenomeno, appare difficile dare la dimostrazione sicura dell'attività protopectinasi.

L'analisi elettroforetica delle pectine da mela aggiunte al mosto

Le tabelle 4, 5 e 6 riportano i risultati dell'analisi elettroforetica delle pectine aggiunte al mosto.

Dalla tabella 4 risulta il progressivo aumento nel tempo della mobilità delle pectine aggiunte, ma i dati della tabella 5 dimostrano come tale aumento di mobilità sia conseguenza soltanto dell'aumentato numero di cariche in seguito all'azione della PME.

Infatti non solo non si nota la comparsa di un nuovo componente pectico, ma i due componenti costituenti le pectine e presenti al tempo 0 conservano la stessa percentuale relativa durante tutto il corso dell'esperienza; si ha una lieve diminuzione nel tempo dei colloidi totali e solamente dopo 24 h la caduta

di concentrazione diventa più marcata ed avviene a spese principalmente del componente pectico più lento e quindi a grandezza molecolare maggiore: la caduta di concentrazione è dovuta evidentemente ad insolubilizzazione e precipitazione delle pectine demetossilate.

Tabella 4
 Mobilità elettroforetica $\times 10^5$ ($\text{cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$) dei componenti del
 mosto aggiunto di pectina da mela e mantenuto a $21,5^\circ \text{C}$
 Ramo ascendente
 Tampone: HCac - NaCac; pH = 6,2; $\mu = 0,1$ (pH del mosto = 3,15)

	u_1	u_2	u_3	u_4
Al tempo 0	+ 0,72		- 7,04	- 8,11
Dopo 1 h	+ 0,80	- 1,93	- 7,16	- 8,07
" 2 "	+ 0,99	- 1,95	- 7,45	- 8,56
" 3 "	+ 0,91	- 2,01	- 7,48	- 8,65
" 4 "	+ 1,04	- 1,94	- 7,51	- 9,00
" 5 "	+ 0,84	- 1,93	- 7,56	- 9,21
" 6 "	+ 0,92	- 1,70	- 7,24	- 9,04
" 7 "	+ 0,69	- 2,04	- 7,56	- 9,69
" 8 "	+ 0,94	- 1,96	- 7,53	- 9,54
" 9 "	+ 0,99	- 1,86	- 7,20	- 9,74
" 10 "	+ 0,76	- 1,84	- 7,53	- 9,87
" 24 "	+ 0,75	- 1,78	- 7,62	- 10,80

Tabella 5
 Concentrazione dei componenti del mosto aggiunto di pectina da mela
 e conservato a $21,5^\circ \text{C}$

	Colloidi totali g/l	Percentuale dei colloidi per via elettroforetica		
		Altri colloidi %	Pectine	
			Componente più lento %	Componente più mobile %
Al tempo 0	1,590	30,6	22,8	46,6
Dopo 1 h	1,585	31,2	22,4	46,4
" 2 "	1,530	30,8	21,2	48,0
" 3 "	1,530	31,2	22,2	46,6
" 4 "	1,585	30,6	19,9	49,5
" 5 "	1,565	31,0	20,1	48,9
" 7 "	1,395	32,7	19,6	47,7
" 8 "	1,345	32,1	20,9	47,0
" 9 "	1,445	31,4	22,6	46,0
" 10 "	1,305	33,0	19,9	47,1
" 24 "	1,260	37,8	14,6	47,6

Tabella 6
 Mobilità elettroforetica $\times 10^5$ (cm² volt⁻¹ sec⁻¹) dei componenti del
 mosto aggiunto di pectina da mela e mantenuto a 13° C
 Ramo ascendente
 Tampone: HCac - NaCac; pH = 6,2; $\mu = 0,1$ (pH del mosto = 3,15)

	u ₁	u ₂	u ₃	u ₄
Al tempo 0	+ 0,72		- 7,04	- 8,11
Dopo 1 h	+ 0,94	- 1,86	- 7,10	- 8,19
„ 2 „	+ 0,90	- 1,71	- 7,03	- 8,43
„ 3 „	+ 0,90	- 1,79	- 7,02	- 8,54
„ 4 „	+ 0,92	- 1,91	- 6,87	- 8,85
„ 5 „	+ 1,01	- 1,88	- 6,92	- 9,13
„ 6 „	+ 0,97	- 1,86	- 6,87	- 9,09
„ 7 „	+ 0,90	- 1,63	- 7,23	- 9,21
„ 8 „	+ 0,96	- 1,69	- 7,34	- 9,25
„ 9 „	+ 0,94	- 1,68	- 7,49	- 9,35
„ 10 „	+ 0,90	- 1,86	- 7,33	- 9,60
„ 24 „	+ 0,93	- 1,82	- 7,23	- 9,98

Il mosto, a parte l'azione demetossilante, non produce sulle pectine da mela aggiunte nessuna modificazione qualitativa e quantitativa.

La PG presente nell'uva manifesta dunque un'azione specifica sulle pectine dell'uva stessa; la specificità è netta, tanto che pectine di altra origine non vengono attecchite dall'enzima.

Notiamo ancora che, a 24 h di distanza dall'aggiunta al mosto, circa il 60 % dei carbossili metilati è stato idrolizzato dall'azione della PME e quindi i carbossili liberi delle pectine da mela rappresentano oltre il 70 % del totale; tuttavia la solubilità delle pectine è ancora notevole, infatti la loro concentrazione supera il 70 % di quella del mosto appena aggiunto.

In un lavoro precedentemente citato (in corso di stampa) abbiamo osservato che le medesime pectine da mela, aggiunte al mosto, scompaiono dopo 8 giorni: solamente a demetossilazione completa e per effetto del tempo le pectine si insolubilizzano, quando manca l'azione della PG.

Le precedenti osservazioni, unitamente al fatto che le pectine naturali del mosto sono pressochè scomparse dopo 24 h, illustrano l'importanza dell'azione della PG nella demolizione delle pectine stesse.

Nella tabella 6 sono riportati i dati relativi al mosto aggiunto di pectina e conservato a bassa temperatura: il quadro colloidale è il medesimo; si nota soltanto un minor aumento nelle mobilità elettroforetiche a causa dell'azione più lenta della PME.

Conclusioni

Nel mosto d'uva esiste una pectinmetilesterasi aspecifica, la quale determina la demetossilazione sia delle pectine del mosto, sia di pectine di altra origine aggiunte al mosto.

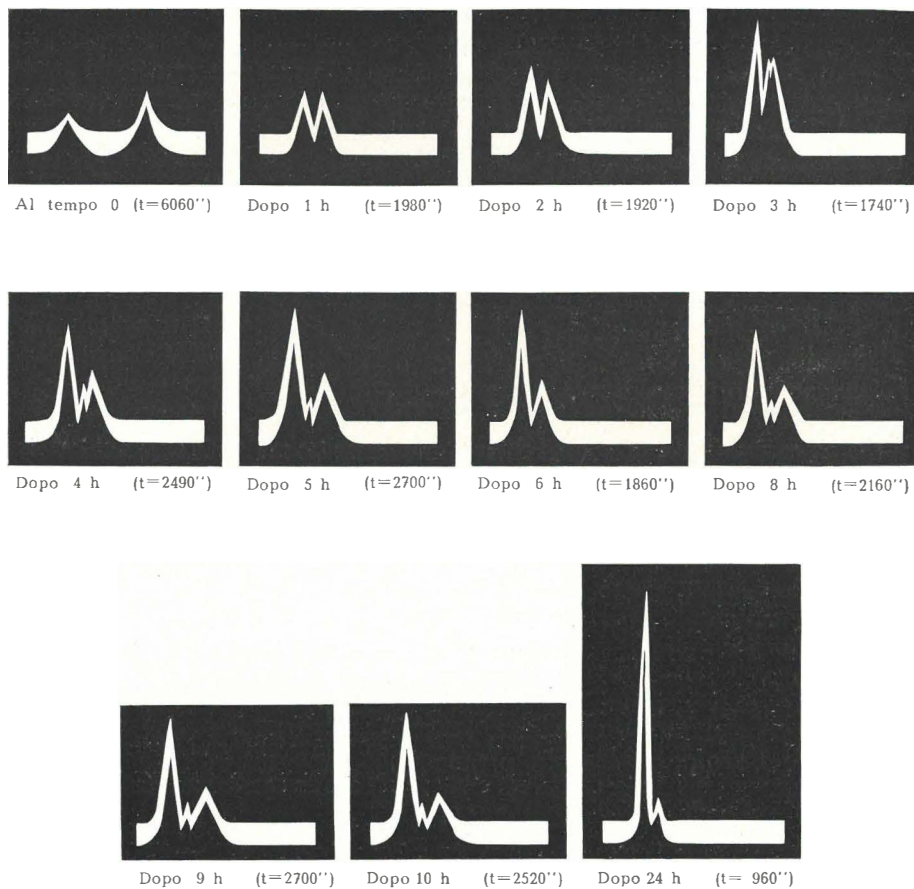


Fig. 2: Elettroferogrammi ottenuti dal mosto tal quale conservato a 21,5° C

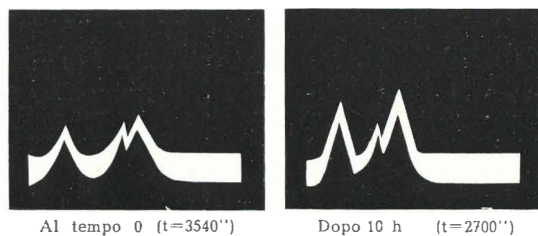


Fig. 3: Elettroferogrammi ottenuti dal mosto aggiunto di pectina da mela e conservato a 21,5° C

L'andamento della demetossilazione è quello di una reazione monomolecolare con coefficiente di temperatura $Q_{10} < 2$.

Il fatto che la demetossilazione enzimatica delle pectine segua l'andamento di una reazione del primo ordine permette una semplice e significativa valutazione dell'attività della PME nel mosto.

Il mosto contiene inoltre una poligalatturonasi specifica che attacca le pectine naturali del mosto stesso, ma è incapace di idrolizzare pectine di origine diversa.

I dati sperimentali avvalorano ancora l'esistenza di una protopectinasi nel mosto; tuttavia, specie a causa delle piccole concentrazioni in gioco, l'attività protopectinasi non appare sicuramente dimostrata.

Bibliografia

- FLANZY, M. et L. BOUZIGUES: Pectines et méthanol dans les moûts de raisin et les vins. Ann. Technol. Agric. **8**, 59 — 67 (1959).
- — et Y. LOISEL: Evolution des pectines dans les boissons et production du méthanol. Ann. Technol. Agric. **7**, 311 — 321 (1958).
- FRANCOT, P. et P. GEOFFROY: Le méthanol dans les jus de fruits, les boissons fermentées, les alcools et spiritueux. Rev. Ferment. Industr. Alim. **11**, 279 - 286 (1956).
- MARTEAU, G., J. SCHEUR et C. OLIVIERI: Cinétique de la libération enzymatique du méthanol au cours des transformations pectolytiques du raisin. Ann. Technol. Agric. **10**, 161 — 183 (1961).
- PEYNAUD, E.: Sur les matières pectiques des moûts de raisin et des vins. Ann. Falsific. Fraudes, **45**, 517 — 518, 11 — 20 (1952).
- SOLMS, J. und H. DEVEL: Über den Mechanismus der enzymatischen Verseifung von Pektinstoffen. Helv. Chimica Acta, **38**, 321 — 329 (1955).
- UINO, L. und T. SALO: Bestimmung des Methanolgehaltes im Sprit mit Chromotrop-säure. Z. Lebensmitt. Unters. u. Forsch. **113**, 129 — 134 (1960).
- USSEGLIO-TOMASSET, L.: Determinazioni elettroforetiche su mosti e su vini. Ann. Sper. Agr. **12**, 855 — 887 (1958).
- — : Alcuni aspetti del metabolismo della *Botrytis cinerea* e del *Penicillium expansum* vegetanti su mosto d'uva. Ann. Sper. Agr. **12**, 1689 — 1705 (1958).
- — : L'evoluzione delle sostanze colloidali dal mosto al vino. Ann. Sper. Agr. **13**, 385 — 404 (1959).
- — : L'esame elettroforetico delle pectine commerciali. Chimica e Indust. **41**, 1089 — 1093 (1959).
- — : I colloidi ceduti al substrato fermentativo dal *Saccharomyces cerevisiae* varietas *ellipsoideus*. Riv. Vitic. Enol. Conegliano, **2**, 63 — 66 (1961).

eingegangen am 27. 12. 1962

Dr. L. USSEGLIO-TOMASSET
Prof. Dott. C. TARANTOLA
Stazione Enologica Sperimentale,
Asti
Italia