



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOTECNOLOGIE AGRARIE

**Dottorato di ricerca in Viticoltura, Enologia e Marketing
delle imprese vitivinicole**

XX CICLO

**ANALISI COMPARATIVA DI ENZIMI DI INTERESSE
TECNOLOGICO PRESENTI IN UVE AUTOCTONE ITALIANE E
NELLE LORO VINACCE**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Ponchia
Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Anna Lante**

Dottorando: Federico Zocca

“L’unico fallimento è smettere di tentare”

Ad Anna e Giovanna

RIASSUNTO

In questa tesi sono stati studiati polifenolossidasi, pectin metilesterasi, β -glucosidasi ed esterasi di due vitigni il Moscato bianco ed il Prosecco. L'obiettivo è stato quello di controllare gli effetti positivi e negativi di queste attività enzimatiche nella fase di conservazione e trasformazione dell'uva e della vinaccia, stabilendo il ruolo di ciascuna in funzione dell'origine vegetale o microbica. Nella caratterizzazione biochimica degli enzimi sono stati utilizzati diversi metodi analitici quali la spettrofotometria, la gascromatografia, l'elettroforesi e l'analisi proteomica con MALDI-TOF. I risultati ottenuti hanno permesso di realizzare un brevetto per il controllo della concentrazione di metanolo nella vinaccia.

ABSTRACT

In this thesis were analysed polyphenoloxidase, pectin methylesterase, β -glucosidase and esterases of two autochthonous grapes Moscato bianco and Prosecco. The aim was to control the positive and negative effects of these enzymatic activities during storage and transformation of grape into wine and distillate and establishing the role of each activity in function of plant or microbial origin. To characterize the enzymes were employed different analytical techniques as spectrophotometry, gascromatography, electrophoresis and MALDI-TOF. The results given the opportunity to realize a patent for the control of methanol concentration in grape pomaces.

INDICE

1. INTRODUZIONE	8
1.1 La <i>Grappa</i> secondo la legge	12
1.2 La vinaccia.....	13
1.3 Composizione della vinaccia	14
1.3.1 Acqua	15
1.3.2 Zuccheri.....	15
1.3.3 Acidi.....	15
1.3.4 Composti polifenolici.....	15
1.3.5 Sostanze pectiche	16
1.3.6 Sostanze pectiche acide.....	16
1.3.7 Sostanze pectiche neutre	18
1.3.8 Cellulosa.....	18
1.3.9 Sostanze aromatiche.....	18
1.4 Microrganismi della vinaccia	19
1.4.1 Lieviti	19
1.4.2 Muffe.....	22
1.4.3 Batteri.....	23
1.5 Conservazione della vinaccia	23
1.6 Composizione della <i>Grappa</i>	24
1.6.1 Aromi varietali	25
1.6.2 Terpeni	26
1.6.3 Aromi di fermentazione	27
1.6.4 Acidi grassi	27

1.6.5 Esteri	28
1.6.6 Alcoli superiori.....	29
1.7 Distillazione.....	29
1.8 Attività enzimatiche.....	31
1.8.1 Esterasi (ESTs).....	31
1.8.2 β -glucosidasi (β G).....	32
1.8.3 Pectin metilesterasi (PME).....	33
1.9 Inibizione della PME	36
1.10 Valutazione dell'imbrunimento enzimatico	36
1.11 Polifenolossidasi (PPO).....	38
1.12 Le polifenolossidasi dell'uva e del vino	40
1.13 Controllo dell'imbrunimento nell'industria alimentare.....	41
1.13.1 Mezzi fisici.....	41
1.13.2 Mezzi chimici.....	43
1.14 La tecnica MALDI-MS	44
2. SCOPO DELLA TESI	53
3. MATERIALE E METODI	55
3.1 Uva e vinaccia	55
3.2 Inoculo della vinaccia.....	55
3.3 Estrazione della proteina	55
3.4 Determinazione della proteina.....	56
3.5 Determinazione spettrofotometrica dell'attività pectin metilesterasica	56
3.6 Determinazione dell'attività esterasica.....	57
3.7 Determinazione dell'attività β -glucosidasica	57
3.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PME, ESTs e β G)	57

3.9 Zimogramma dell'attività pectin metilesterasica	58
3.10 Zimogramma dell'attività esterasica	58
3.11 Zimogramma dell'attività β -glucosidasica	58
3.12 Distillazione delle vinacce (T_0 , T_1 , T_F).....	59
3.13 Distillazione con impianto pilota (T_F)	59
3.14 Analisi gascromatografica (alcol, esteri e terpeni)	59
3.15 Analisi sensoriale.....	60
3.16 Determinazione su piastra dell'attività pectin metilesterasica	60
3.17 Effetto degli inibitori sull'attività pectin metilesterasica	61
3.18 Purificazione dell'inibitore PMEI da <i>Actinidia chinensis</i>	61
3.19 Purificazione dell'inibitore PMEI espresso in <i>Pichia pastoris</i>	62
3.20 Determinazione dell'inibizione della PME in mosto e vinacce	62
3.21 Determinazione del grado di metilazione (GM) e del contenuto di acidi uronici ...	63
3.22 Determinazione dell'attività polifenolossidasi	64
3.23 Optimum di pH dell'attività polifenolossidasi.....	65
3.24 Stabilità termica dell'attività polifenolossidasi.....	65
3.25 Effetto degli inibitori sull'attività polifenolossidasi	65
3.26 Elettroforesi della PPO in Nativa-, SDS-, IEF- e Deriphat-PAGE	65
3.27 Preparazione del disodio-N-lauril- β -iminodipropionato (Deriphat)	66
3.28 Preparazione della soluzione di Deriphat	66
3.29 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (2-DE) della polifenolossidasi	67
3.30 Zimogrammi dell'attività polifenolossidasi (L-DOPA/MBTH).....	67
3.31 Zimogrammi dell'attività polifenolossidasi (<i>t</i> BC/ADA)	67
3.32 Densitometria degli zimogrammi dell'attività polifenolossidasi.....	68
3.33 Preparazione del campione per l'analisi MALDI-TOF	68

3.34 Digestione con tripsina dei gel colorati in Coomassie	68
3.35 Analisi MALDI-TOF.....	69
3.36 Ricerca in database	70
3.37 Analisi statistica.....	70
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	72
5. CONCLUSIONI	86
6. ALLEGATI	88
7. BIBLIOGRAFIA	108
8. RINGRAZIAMENTI	126
 PRINCIPALI LAVORI PUBBLICATI NELL'AMBITO DEL DOTTORATO	

1. INTRODUZIONE

Gli enzimi sono i principali responsabili delle trasformazioni biochimiche che coinvolgono, i diversi composti dell'uva, nella produzione di vino e *Grappa*.

Il termine “enzima” coniato da Willy Kühne nel 1878, con il suo significato letterale “nel lievito” ci ricorda che le attività enzimatiche sono di origine microbica, ma accanto a queste si manifestano anche quelle presenti nel vegetale che possono modificare, in maniera significativa, le caratteristiche della materia prima.

La comprensione del ruolo che entrambe possono giocare singolarmente o in sinergia è sicuramente una sfida per il miglioramento della qualità, anche del prodotto finito. A questo proposito la letteratura fa riferimento a studi effettuati su uve di vitigni internazionali e considera, in prevalenza, la produzione vinicola, trascurando il settore della *Grappa*.

Attualmente la “riscoperta” dei vitigni autoctoni non solo come patrimonio del passato, ma anche come ricchezza per il futuro ha messo in luce le scarse conoscenze scientifiche nel settore, stimolando la ricerca per colmare queste lacune.

Non si può infatti dimenticare che la produzione di vino e distillati dovrebbe dipendere da precise scelte tecnologiche, in funzione del vitigno e quindi dell'uva e della vinaccia utilizzata. Ad esempio le tecniche enologiche, frutto di anni di ricerca e sperimentazione su uve di vitigni internazionali, spesso vengono erroneamente ritenute valide e applicate anche a varietà autoctone, che possono presentare importanti differenze a livello della loro composizione chimica ed enzimatica.

La medesima riflessione potrebbe essere estesa anche al settore della *Grappa*, dove la valorizzazione del prodotto di pregio, come può essere la vinaccia ottenuta da un vitigno autoctono, è frutto soprattutto della pratica e non di ragionamenti basati su evidenze scientifiche.

In questa tesi viene affrontato questo aspetto, spesso trascurato, con un approccio biochimico. Lo studio di β -glucosidasi, esterasi, pectin metilesterasi e polifenolossidasi, isolati da uve di due vitigni autoctoni, offre lo spunto per alcune riflessioni. Inizialmente viene considerato il legame tra uva e vinaccia per verificare se è possibile stabilire, per lo stesso enzima estratto dal vegetale o presente in microrganismi isolati dal medesimo, un “ruolo” sulla qualità della materia prima e poi del prodotto finito.

La *Grappa* è un distillato esclusivamente italiano, si ricava dalle bucce degli acini d'uva separate dal mosto o dal vino al termine della fermentazione alcolica. Questo ne determina in modo inequivocabile il carattere, la storia tecnologica, la difficoltà nella produzione e di conseguenza il suo valore.

Nel processo di produzione, le caratteristiche compositive della materia prima, in questo caso vinacce di Moscato bianco e Prosecco, e la conduzione della distillazione assumono un ruolo fondamentale per ottenere un prodotto di pregio, in cui risultano esaltate le note aromatiche ed olfattive.

Le fasi tecnologiche che vanno dalla separazione della vinaccia dal mosto alla sua distillazione sono tra le più delicate, in quanto nessun metodo di distillazione è in grado di rimediare alle caratteristiche negative di una materia prima alterata. Durante questo periodo la vinaccia viene conservata in silos di materiali e dimensioni diverse o in tunnel di materiale plastico, per periodi variabili da pochi giorni fino a parecchie settimane, a seconda dell'organizzazione aziendale, della varietà lavorata e delle dimensioni degli impianti di distillazione.

La vinaccia, soprattutto se non fermentata, detta "verGINE", ha valori di pH debolmente acidi, notevoli quantità di risorse energetiche e consistenti volumi d'aria, tutti fattori che la rendono un substrato ideale per enzimi e microrganismi. Il processo più importante è la fermentazione alcolica, ad opera dei lieviti, ma vengono contemporaneamente innescate diverse vie metaboliche che concorrono a modificare in modo rilevante il profilo aromatico e qualitativo delle vinacce stesse; soprattutto per quanto riguarda la presenza di alcoli superiori ed esteri etilici di alcuni acidi grassi a corta e media catena, che sono i maggiori responsabili dell'aroma secondario dei distillati (Carnicini & Del Pozzo, 1986). Attraverso la distillazione viene estratta dalla vinaccia la componente volatile, concentrata la frazione alcolica e le sostanze aromatiche di pregio, cercando di separare nel contempo quelle indesiderabili. Gli impianti di distillazione possono contribuire solo a migliorare un prodotto già potenzialmente di buon livello, ma non trasformare una materia prima scadente in un distillato di qualità.

Diventa quindi primario l'obiettivo di ricercare i mezzi più efficaci per limitare i difetti e le cause che li generano ed esaltare le caratteristiche di qualità, nel rispetto di quanto prodotto dalla vite, tenendo in grande considerazione l'esigenza di differenziare la *Grappa* in base alla varietà dell'uva, alle caratteristiche ambientali in cui viene prodotta e alla tecnologia di distillazione.

Gli interventi tecnologici più frequenti sulla vinaccia, durante la sua conservazione, si pongono come principale obiettivo il miglioramento della resa alcolica e del decorso fermentativo, ma non considerano realmente la possibilità di controllare, a partire dalla materia prima, eventuali difetti e l'evoluzione del patrimonio aromatico.

L'inoculo della vinaccia, con ceppi di lievito selezionati, tecnica già applicata con successo nell'ambito della produzione dei vini per il consumo diretto o destinati alla produzione del brandy (Carnacini *et al.*, 1993), ha trovato di recente impiego anche nell'ambito della produzione della *Grappa*. Tale intervento viene comunque effettuato impiegando ceppi enologici, dimenticando che i caratteri enologici non hanno importanza univoca. Spesso, in distilleria, si prendono decisioni che comportano impegni economici rilevanti, come l'impiego di ceppi selezionati da distribuire sulla vinaccia prima del suo insilamento, senza una effettiva conoscenza delle condizioni ottimali di impiego e soprattutto senza le basi scientifiche per valutare, correttamente, i benefici eventualmente ottenuti. In base a questi presupposti è sicuramente interessante poter valutare il reale effetto dell'inoculo di un ceppo di lievito commerciale sulla vinaccia, durante l'insilamento.

Successivamente nel presente elaborato si considera la possibilità di un controllo delle attività enzimatiche, soprattutto di quelle responsabili di difetti, come possono essere la pectin metilesterasi e la polifenolossidasi.

Dal punto di vista tecnologico l'azione della pectin metilesterasi (PME), responsabile della produzione di metanolo, è sicuramente una delle attività enzimatiche da tenere sotto osservazione durante il processo di conservazione della vinaccia.

Il metanolo è infatti un composto tossico con precisi limiti legali. La sua presenza nella vinaccia costituisce un problema per la *Grappa* in quanto una sua eccessiva concentrazione, richiede una ri-distillazione con colonna demetilante, con la conseguente modificazione delle caratteristiche aromatiche del prodotto.

È noto che per inattivare le pectin metilesterasi vegetali endogene possono essere utilizzati trattamenti ad alte temperature e pressione. Questi processi sono però complessi e costosi sotto il profilo del consumo energetico ed incidono negativamente sulla qualità del prodotto finale. Inoltre non sempre si ottiene l'effetto desiderato poiché esistono isoforme delle PME estremamente termostabili che possono rimanere attive anche dopo severi trattamenti termici. Per questo è stata effettuata la ricerca di metodi di controllo dell'enzima, un obiettivo dai chiari connotati applicativi.

Un altro problema di rilevante interesse tecnologico è il fenomeno dell'imbrunimento enzimatico.

Nel mondo, la maggior parte delle perdite dei prodotti ortofrutticoli è causata da reazioni degradative in post-raccolta. La polifenolossidasi, enzima presente in molti frutti e vegetali, è responsabile dell'ossidazione dei composti fenolici dei prodotti freschi, sottoposti a processi di trasformazione, con un conseguente imbrunimento enzimatico. Questo comporta un peggioramento delle caratteristiche organolettiche in quanto associato a cambiamenti di colore e gusto. Tuttavia in altri alimenti come caffè, cacao e the, tali reazioni sono desiderate per i miglioramenti qualitativi apportati.

I principali fattori che determinano il grado d'imbrunimento nella frutta e nei vegetali sono: l'attività polifenolossidasi (PPO), la concentrazione di sostanze fenoliche, il pH, la temperatura e la disponibilità di ossigeno nei tessuti (Martinez, Whitaker, 1995).

La polifenolossidasi è presente molto probabilmente in tutte le piante (Zawitowski *et al.*, 1991) e livelli significativi di attività si riscontrano soprattutto in frutti ricchi in sostanze fenoliche come l'uva, dove varia nel corso dello sviluppo mostrando un picco durante la maturazione fisiologica.

In questa tesi si è effettuato uno studio della polifenolossidasi presente in uve Moscato bianco e Prosecco. L'attività enzimatica è causa di un rapido imbrunimento di mosti e vini durante la fase di trasformazione e per questo l'inibizione della PPO ha un elevato interesse tecnologico. In questo caso l'approccio è stato più squisitamente proteomico, gettando le basi per la creazione di interessanti sinergie con la spettrometria di massa nell'individuazione di validi inibitori enzimatici.

1.1 La Grappa secondo la legge

La legislazione italiana sulle acquaviti è basata sulla legge n. 1559 del 1951, integrata da successive normative comunitarie, Reg. n. 1576 del maggio 1989, ed italiane, decreto n. 297 del 1997 (Gazzetta Ufficiale, 12 settembre 1997; Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998).

Il Reg. n. 1576/89 della Comunità Europea definisce “acquavite di vinaccia o marc”, la bevanda spiritosa ottenuta da vinacce fermentate e distillate direttamente mediante vapor acqueo oppure dopo aggiunta di acqua e con eventuale aggiunta di feccia, rispettivamente 20% in peso sulla vinaccia o 35% della gradazione alcolica (Gazzetta Ufficiale, 22 dicembre 1984). L'importanza di questa normativa risiede nel fatto che la denominazione “grappa” è riservata esclusivamente alla bevanda spiritosa prodotta in Italia. Il decreto n. 297 del 1997 completa la disposizione comunitaria, precisando che la "grappa" deve provenire da uve prodotte e vinificate entro i confini nazionali (Gazzetta Ufficiale, 12 settembre 1997).

La legge 1559 del 1951 con l'articolo 1 definisce i limiti legali nella composizione delle acquaviti ottenute dal processo di distillazione e da eventuali distillazioni di affinamento. La gradazione alcolica non deve essere inferiore a 38° (37.5° secondo le disposizioni riportate nel Regolamento CEE n. 1576/89, né superiore a 86° dell'alcolometro ufficiale adottato dall'Amministrazione finanziaria. All'articolo 2 si stabilisce che le acquaviti poste in commercio debbono essere: “stabilmente limpide e non debbono contenere acidi minerali, metalli tossici, sostanze estranee alla loro specifica composizione e comunque, nocive alla salute, salvo quelle tolleranze normali che, per ciascuna specie, tenuto conto dello stato d'invecchiamento, corrispondono alla migliore tecnica praticata nella lavorazione e nella conservazione”.

Viene inoltre precisato che l'alcol metilico non può superare il quantitativo di 1 g (1.266 ml) per ogni 100 ml di alcol etilico anidro (a.a.), mentre le sostanze volatili diverse dall'alcol etilico e metilico debbono essere presenti in una quantità minima di 140 mg per 100 ml di a.a. Sono infatti le così dette “impurezze” che caratterizzano la grappa rispetto agli altri distillati.

La legislazione Comunitaria prevede l'assenza (<10 mg/l) di anidride solforosa nei distillati. Inoltre, il decreto n. 297 del 1997 consente di utilizzare diverse denominazioni per qualificare la grappa a patto che vengano rispettate precise condizioni produttive, quali la possibilità di identificare i vari tipi di vinaccia e di tenere separati le differenti

partite di grappa da esse prodotte. Sono riconosciute come grappe ad indicazione geografica tipica (Piemonte, Lombardia, Veneto, Trentino, Alto Adige, Friuli, Toscana) quelle le cui vinacce siano ottenute da uve prodotte e vinificate nell'area specifica e distillate nell'ambito geografico a cui fa riferimento l'indicazione. Relativamente alla grappa monovitigno si potrà apporre in etichetta il nome del vitigno di provenienza qualora la grappa derivi per almeno l'85% da vinacce della varietà indicata. Se sono due i vitigni preminenti, di cui il secondo nella percentuale di almeno il 15%, verranno citati entrambi, in ordine decrescente. Se la materia prima deriva da un vino DOCG, DOC o IGT lo si potrà indicare in etichetta. È inoltre sancito il riferimento all'alambicco usato per la distillazione delle vinacce. Relativamente alle grappe ad indicazione geografica tipica, esse devono avere un titolo alcolometrico di almeno 40% in volume (Gazzetta Ufficiale, 12 settembre 1997; Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998).

La grappa, come tutti gli spiriti, viene gravata da un'imposta di fabbricazione il cui accertamento viene effettuato dal funzionario dell'Amministrazione finanziaria (U.T.I.F., Ufficio Tecnico Imposte di Fabbricazione) (Odello, 1988; Venturini, 1998); inoltre, il medesimo ente preposto dallo Stato, ha il compito di controllare tutti i movimenti che avvengono all'interno di una distilleria (De Rosa & Castagner, 1994; Goi & Odello, 1981).

1.2 La vinaccia

La legislazione italiana definisce “vinaccia” il complesso delle parti solide dell'uva, quali bucce e vinaccioli, in presenza o meno del raspo (Gazzetta Ufficiale, 16 dicembre 1998), ma è solo la buccia, con il mosto rimasto inglobato in essa, a fornire la quasi totalità di composti che, con la distillazione, caratterizzano la grappa.

La buccia o epicarpo è la membrana che racchiude la polpa ed i vinaccioli; formata da un'epidermide di 6-10 strati di cellule appiattite, ricoperte da una sostanza cerosa detta pruina, costituisce il substrato ideale per i lieviti e gli altri microrganismi.

I vinaccioli, normalmente in numero di due o tre per acino, sono ricoperti da una robusta epidermide che li rende passivi sia al processo fermentativo sia a quello della distillazione e rappresentano il 25-35% in peso della vinaccia fresca diraspata (De Rosa & Castagner, 1994). Il raspo, formato da un'asse centrale da cui si diramano i racimoli, è costituito per la maggior parte da sostanze cellulosiche, piccole quantità di glucidi semplici e da sali organici e minerali.

La sua presenza è legata alla tecnologia enologica utilizzata al momento della pigiatura. Nella produzione dei vini bianchi ad esempio, l'utilizzo delle presse orizzontali, a compressione meccanica o a polmone, determina il conferimento in distilleria di vinacce contenenti i raspi. Questi ultimi si rivelano un'appendice indesiderata durante l'insilamento in quanto ostacolano una perfetta costipazione della massa di vinacce, favorendo la presenza di sacche d'aria. Anche se le vinacce sono sempre state considerate un sottoprodotto della vinificazione, sta prendendo piede la convinzione che solo la vinaccia di qualità può produrre buona grappa. Oggi il vino è certamente il più tutelato e la tecnologia è sicuramente finalizzata a ottenerlo di elevata qualità senza curarsi se le scelte sono compatibili con la successiva produzione di una grappa di altrettanto pregio (Odello *et al.*, 1997). Soprattutto nel caso dei vini bianchi, le vinacce vengono consegnate in distilleria appena separate dal mosto, ricche di zuccheri fermentescibili e quindi completamente prive di alcol. Per questo si dicono "vergini" o dolci e non sono ovviamente distillabili senza preventiva fermentazione. Queste sono fatte fermentare cercando di controllare, quando possibile, andamento e velocità del processo fermentativo, responsabili, in buona misura, della qualità finale della vinaccia. Nella produzione di vini rosati o di rossi leggeri le vinacce sono invece chiamate "semifermentate" in quanto, nelle prime fasi della vinificazione, sono mantenute insieme al mosto. Durante la vinificazione in rosso le vinacce subiscono il processo fermentativo con il mosto e poiché gli zuccheri vengono trasformati in alcol, si dicono fermentate. La vinaccia già fermentata può essere immessa direttamente nell'alambicco oppure conservata, se possibile, per tempi brevi. Indicativamente da 100 kg di uva fresca si ricavano 80-85 kg di mosto, 9-10 kg di vinaccia (intesa come buccia), 3-4 kg di vinaccioli e 3-4 kg di raspi. Il valore commerciale di questo "sottoprodotto" della vinificazione dipende dalla quantità di zuccheri e alcool, dalla presenza o meno di raspi, sempre sgraditi, e dall'umidità. Questo parametro è strettamente correlato all'intensità della pressatura in cantina che, se raggiunge soglie elevate, può causare con la perdita del mosto anche un minore contenuto in zuccheri e di conseguenza in alcool.

1.3 Composizione della vinaccia

La composizione delle vinacce, varia con l'andamento stagionale, il vitigno, il luogo di provenienza, l'epoca di vendemmia ed anche la tecnologia di vinificazione. Chimicamente le vinacce sono costituite da:

1.3.1 Acqua

La sua percentuale dipende dallo stato di maturazione al momento della raccolta e dalle condizioni vegetative in cui la pianta si trova, ma non dall'umidità della vinaccia che, come detto precedentemente, è conseguenza della presenza del mosto e quindi correlata al contenuto zuccherino.

1.3.2 Zuccheri

Gli zuccheri presenti nelle vinacce sono il glucosio e il fruttosio in pari concentrazione, anche se i lieviti nella demolizione glucidica attaccano preferibilmente il glucosio trasformandolo in alcol etilico, con un rendimento teorico del 60%.

1.3.3 Acidi

Rispetto al mosto, le vinacce presentano minore acidità titolabile e un più elevato valore di pH. L'acidità fissa (1-2%) è per lo più dovuta all'acido tartarico e in minor misura agli acidi malico, citrico, succinico in gran parte salificati da potassio, calcio e magnesio. L'acidità è influenzata dalla varietà dell'uva, dall'andamento stagionale (annate fredde e piovose corrispondono a valori più bassi di pH) e dalla quantità di mosto che rimane inglobata nelle vinacce. Il pH del mosto oscilla fra 2.8 e 3, di conseguenza la vinaccia fermentata insieme al mosto avrà valori più bassi rispetto alla vinaccia vergine che può raggiungere livelli di pH compresi tra 3.8 e 5.5. Questo parametro è particolarmente utile sia per l'azione selettiva dei bassi valori di pH sui lieviti della fermentazione alcolica, sia per l'azione inibente nei riguardi dei batteri lattici. Lunghi periodi di insilamento provocano sempre una perdita di acidità fissa e l'aumento del tenore di acidità volatile, a causa dell'attività batterica che interessa parzialmente l'acido tartarico e altri acidi organici, come il malico.

1.3.4 Composti polifenolici

Nelle bucce sono presenti sostanze polifenoliche e pigmenti coloranti. La percentuale dei primi è compresa nell'intervallo 1-2%, mentre nei vinaccioli il valore sale al 5-6%. I

principali pigmenti coloranti delle uve rosse sono gli antociani, dotati di proprietà antiossidanti, utili soprattutto durante i lunghi periodi di insilamento.

1.3.5 Sostanze pectiche

Sono un gruppo molto eterogeneo di polimeri strutturali che costituiscono la parete primaria e la lamella mediana delle cellule vegetali.

Alcuni autori come Peynaud (1952), Buchi & Deuel (1954), Usseglio-Tomasset (1978) e Dubourdieu (1982) distinguono le sostanze pectiche dell'uva in pectine e gomme.

- PECTINE: sono catene formate quasi esclusivamente da unità di acido galatturonico, parzialmente esterificate da metanolo. Il grado di esterificazione delle pectine dell'uva è particolarmente alto (70-80%). Gli omogalatturonani presentano legami glicosidici α -(1,4) e sono facilmente separati dagli altri polisaccaridi solubili tramite reazioni di saponificazione, in cui la pectina è trasformata in acido pectico; quest'ultimo, in presenza di cloruro di calcio, precipita sotto forma di pectato. L'idrolisi del precipitato produce solo acido galatturonico. Questi composti sono assenti in mosti ottenuti da uve affette da marciume, in quanto vengono idrolizzati dalle endo-poligalatturonasi prodotte da *B. cinerea* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Nelle uve sane, invece, la scomparsa delle pectine è dovuta all'azione di enzimi pectolitici endogeni o da quelli aggiunti in vinificazione; di conseguenza, alla fine della fermentazione alcolica, i vini praticamente non contengono omogalatturonani.

- GOMME: sono polisaccaridi solubili non pectici, costituiti da zuccheri neutri, principalmente arabinosio, ramnosio, galattosio e piccole quantità di xilosio, mannosio e glucosio. Le gomme sono residui della trasformazione, operata da pectinasi endogene o esogene, delle sostanze pectiche presenti nel mosto. Brillouet (1987) ha suddiviso i polisaccaridi presenti nel mosto in sostanze pectiche acide e neutre, a seconda che le molecole contengano o meno acido galatturonico.

1.3.6 Sostanze pectiche acide

Le pectine sono un gruppo molto eterogeneo di polimeri strutturali che costituiscono, insieme a cellulosa, emicellulosa, enzimi e proteine, la parete primaria e la lamella mediana della cellula vegetale, conferendo rigidità e resistenza meccanica alla struttura. Sono circa il 35% del peso secco delle pareti delle dicotiledoni e si trovano anche nelle

gimnosperme (Micheli, 2001). È stato dimostrato (Micheli, 2001) che le pectine vengono polimerizzate nel CIS Golgi, metilate nel Golgi mediale e sostituite con catene laterali nelle cisterne del TRANS Golgi. Al termine del processo biosintetico vengono secrete nella parete come forme altamente esterificate. Chimicamente sono molecole di polisaccaridi con una spina dorsale ramno-galatturonica costituita da regioni di α -D-1,4 acido galatturonico (dette “*smooth region*”) che possono essere parzialmente metil-esterificate in posizione 6, interrotte da inserzioni di residui α -L-ramnosil 1,2 (Figura 1). Agli atomi C 3 e/o C 4 delle unità di ramnosio e agli atomi C 2 e/o C 3 dell’acido galatturonico sono attaccati con legami glicosidici catene laterali di zuccheri “neutri” che conferiscono alla parte ramno-galatturonica del midollo di pectina il carattere di “*hairy region*” (Pilnik & Voragen, 1991).

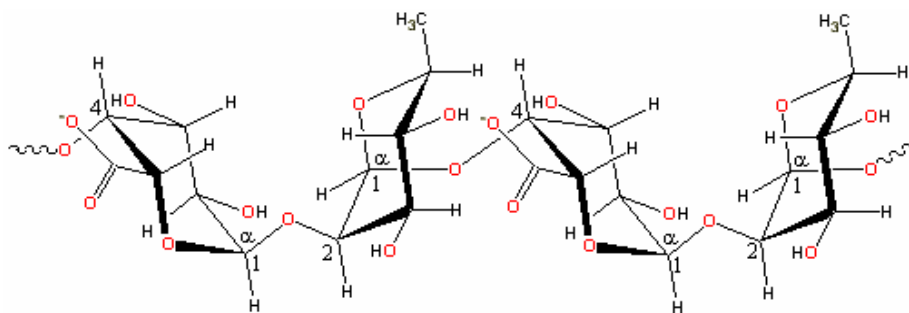


Figura 1. Struttura chimica della pectina.

Si identificano due tipi di catene laterali nelle “*hairy region*”: arabinogalattani (AG-II) in maggioranza e arabinani (A). Gli arabinogalattani delle sostanze pectiche vegetali sono suddivisi a loro volta in:

Arabinogalattani I (AG-I): sono i più diffusi e sono costituiti da una catena principale di unità galattosio, legate con legame β -(1,4), con ramificazioni sul carbonio 3, costituite da unità individuali o oligomeri di arabinosio legati da legame α -(1,5). Arabinogalattani II (AG-II): hanno struttura più complessa; la catena principale è costituita da unità di galattosio legate da legami glicosidici β -(1,3) con corte catene laterali di galattosio legate in β -(1,6). In C 3, queste sono sostituite da unità di arabinosio. Possiedono anche alcune unità di arabinosio sul carbonio 6 o 4 del galattosio, nelle catene principali o secondarie. Gli arabinogalattani sulla “*hairy region*” delle sostanze pectiche acide, nel mosto d’uva, sono di tipo II. Gli arabinani invece, sono catene laterali delle sostanze pectiche acide, formate da unità di arabinosio, legate in α -(1,5), con singoli arabinosi sul

carbonio C 3 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Le pectine estratte dalla maggior parte dei frutti hanno generalmente un grado di esterificazione DE (% di monomeri di acido galatturonico metil-esterificati) superiore al 70% (Pilnik & Voragen, 1991). Queste vengono degradate durante la maturazione, grazie all'attività di enzimi pectolitici endogeni che provocano la rottura della catena principale di pectina o delle catene laterali, rendendo così la pectina più solubile e provocando la perdita di consistenza del vegetale.

1.3.7 Sostanze pectiche neutre

Hanno strutture molecolari simili alle ramificazioni laterali delle sostanze pectiche acide, costituite da arabinani e arabinogalattani di tipo II, ma sono più lineari delle “*hairy region*”. La percentuale di sostituzione delle catene di galattosio rispettivamente sui carboni 1 e 6 è più bassa ed il galattosio risulta sostituito solo da arabinosio in C 3 . Hanno un peso molecolare medio di 165000 Da. Generalmente, gli AG-II presentano una piccola sezione peptidica costituita principalmente da aminoacidi quali, idrossiprolina, serina, glicina e alanina. Gli arabinogalattani di tipo II sono infatti, arabinogalattani proteine (AGP).

1.3.8 Cellulosa

Il 10-20% delle bucce è composto da cellulosa, polimero polisaccaridico del β -glucosio. Caratteristiche di questa molecola sono l'insolubilità in acqua e la scarsa conducibilità termica, che la fanno ritenere un materiale coibente.

1.3.9 Sostanze aromatiche

Gli strati più interni della buccia sono sede della maggior parte degli aromi varietali, molecole odorose come linalolo (responsabile dell'aroma del Moscato), nerolo, citronellolo e geraniolo appartenenti alla famiglia dei terpeni. Questi possono essere presenti in forma idrocarburica, aldeidica, alcolica, acida ed esterificata come linalil-, geranil- e neril-acetato. Pur avendo un punto di ebollizione elevato (dai 150° ai 198°C), gli aromi varietali secondo alcuni autori (De Rosa & Castagner, 1994; Odello *et al.*, 1997) sono in grado di passare dalla vinaccia all'acquavite rendendola riconoscibile

organoletticamente. Non tutti i vitigni sono dotati di molecole aromatiche e questo consente la distinzione fra varietà a frutto neutro e varietà a frutto aromatico come Moscato, Malvasia, Müller Thurgau, Riesling, Silvaner, Sauvignon e Traminer. Comunque la dotazione aromatica delle uve dipende anche dall'andamento stagionale, le annate piovose influiscono negativamente sul livello di terpeni.

1.4 Microrganismi della vinaccia

1.4.1 Lieviti

I lieviti sono funghi unicellulari che si moltiplicano per gemmazione o scissione (Zambonelli, 1998). Le cellule vegetative possono essere globose o subglobose, ellittiche o cilindriche lunghe mediamente 4-10 μm , raggiungendo valori anche superiori a 30 μm ; la riproduzione sessuata avviene attraverso la produzione di ascospore, contenute all'interno di strutture particolari dette aschi.

I generi di lieviti conosciuti sono circa 100 di cui 15 di interesse enologico. Infatti nonostante il gran numero di ricerche su *S. cerevisiae*, come cellula eucariota modello, è ancora poco approfondito l'aspetto della biodiversità dei lieviti, specialmente quelli di interesse enologico (Pretorius, 2000).

Esistono numerosi fattori che influiscono sul tipo di microflora presente nelle uve e quindi nella vinaccia, tra questi ricordiamo la varietà, la temperatura, la piovosità ed altri fattori climatici, il suolo, la fertilizzazione, l'irrigazione, la fase fenologica in cui le uve vengono esaminate, i danni fisici causati dalle muffe, insetti ed uccelli e l'uso di fungicidi. È importante notare che le attrezzature per la raccolta ed i contenitori rappresentano dei luoghi di accumulo di attività microbica prima che le uve raggiungano la cantina.

Kloeckera e *Hanseniaspora* sono le specie più presenti sulla superficie degli acini (circa il 50-75% della popolazione totale dei lieviti) (Fleet & Heard, 1993; Fleet, 1998) seguite da *Candida* (*C. stellata* e *pulcherrima*), *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Rhodotorula* (Fleet & Heard, 1993; Fleet, 1998). Risulta invece controversa l'origine delle specie fermentative di *S. cerevisiae*. Alcuni sostengono che la fonte primaria di questo lievito sia il vigneto (Török *et al.*, 1996), altri ritengono invece che si trovi nelle cantine, specialmente negli impianti di fermentazione (Martini 1993; Vaughan-Martini & Martini, 1995). La flora di cantina

risulta abbondante nel succo d'uva e sulla superficie degli impianti enologici ed è costituita da *S. cerevisiae*, *Candida* e *Brettanomyces* (Fleet & Heard, 1993; Fugelsang, 1997). Nel corso dell'insilamento si instaurano delle dinamiche di popolazione per cui alcune prendono il sopravvento su altre al variare della composizione chimica del mezzo, della temperatura, della concentrazione alcolica e della presenza di anidride solforosa. Di conseguenza dopo l'avvio della fermentazione, che rappresenta la fase più delicata del processo, alcuni ceppi saranno sostituiti da altri più adatti alle condizioni ambientali.

Durante la fermentazione la pressione selettiva favorisce sempre lieviti *Saccharomyces sensu stricto* rappresentati in modo predominante dalla specie *S. cerevisiae* che possiedono un catabolismo fermentativo più efficiente e per questa ragione vengono considerati "lieviti enologici" (Bovo, 2005).

Per questo motivo, secondo alcuni autori (De Rosa & Castagner, 1994), è conveniente utilizzare nell'insilamento lieviti selezionati per avviare in modo ottimale la fermentazione, in quanto la fermentazione spontanea del mosto d'uva può essere considerata un processo microbico eterogeneo che coinvolge lo sviluppo sequenziale di diversi lieviti ed altre specie microbiche.

I lieviti, per la loro sussistenza, necessitano di una fonte energetica costituita preferibilmente da zuccheri a sei atomi di carbonio, quali glucosio e fruttosio.

La demolizione del glucosio avviene attraverso la glicolisi che prevede diversi passaggi catalizzati da altrettanti enzimi (Sols *et al.*, 1971; Bolognani, 1974). Nella glicolisi sono individuabili due stadi successivi, il primo è endoergonico, perchè richiede 2 ATP e si forma gliceraldeide-3-fosfato; mentre nella seconda fase esoergonica vengono prodotti 4 ATP ed acido piruvico (Zambonelli, 1998). Quest'ultimo è l'intermedio comune di glicolisi e fermentazione alcolica; ma mentre nel primo caso il processo continua con il ciclo di Krebs nel secondo avviene la decarbossilazione dell'acido piruvico ad acetaldeide e quindi la riduzione di quest'ultima ad alcol etilico per permettere la riossidazione del NAD.

Con la fermentazione alcolica il lievito trasforma il glucosio in alcol etilico ed anidride carbonica producendo anche altri composti secondari. Dal punto di vista del lievito l'etanolo è un prodotto di scarto e la riduzione dell'acetaldeide in etanolo è necessaria per permettere la riossidazione del NADH_2 a NAD. Inoltre, possibili blocchi nei diversi passaggi inducono la formazione di composti diversi dall'etanolo. Così, un eccesso di

anidride solforosa, sottraendo dall'equilibrio l'aldeide acetica, favorisce la formazione di glicerina attraverso la cui via di sintesi è possibile recuperare potere riducente.

La formazione dei prodotti secondari della fermentazione alcolica è rappresentata dall'equazione di Genevois, $2A+B+2M+H+5S = \Sigma = G$, dove:

A = acido acetico

B = butilenglicole

M = acetoino

H = acetaldeide

S = acido succinico

G = glicerina

I rapporti possono in pratica variare in base alla composizione del mezzo (Zambonelli, 1998). Inoltre l'andamento della fermentazione alcolica è influenzato da alcuni parametri:

- temperatura
- presenza di ossigeno
- presenza di anidride solforosa
- livello di acidità
- condizioni di nutrizione dei lieviti alcoligeni

La temperatura ottimale per il lievito varia tra i 15° e i 30°C. Le basse temperature riducono l'attività fermentativa, mentre le alte temperature peggiorano la qualità del prodotto accelerando il metabolismo ossidativo dei lieviti, che demoliscono più velocemente lo zucchero, con una minor resa alcolica.

Il conferimento delle vinacce in distilleria comincia a settembre con le varietà più precoci, per terminare in novembre con quelle più tardive. In quest'ultimo periodo, le basse temperature possono ritardare l'avvio fermentativo.

D'altra parte nei mesi più caldi, le alte temperature di fermentazione, favoriscono un'elevata produzione di acidità volatile e possibili avvii di fermentazioni batteriche sempre indesiderate.

Il lievito si riproduce prevalentemente in condizione aerobiche, ma ciò non costituisce un problema in quanto le vinacce sono dotate di una quantità sufficiente d'ossigeno per la moltiplicazione cellulare.

L'azione antisettica dell'anidride solforosa favorisce lo sviluppo di lieviti *Saccharomyces*, inibendo microrganismi patogeni e lieviti selvaggi. L'acido solforoso, inoltre, esercita una protezione contro eventuali ossidazioni, le quali risultano dannose

soprattutto nelle uve bianche, che stoccate in silos presso le cantine, cominciano a fermentare prima del loro trasferimento e stivaggio in distilleria.

L'utilizzo di questo additivo non è sempre desiderato, esso può causare ritardi nell'avvio della fermentazione alcolica e creare problemi agli impianti di distillazione, attaccando il rame delle colonne. Inoltre un buon tenore in acidità inibisce l'attività dei batteri, che vengono inattivati a valori di pH prossimi a 3 favorendo contemporaneamente i lieviti. Questi ultimi necessitano di elementi nutritivi quali: sostanze azotate, fosforate e sali minerali per la formazione delle proteine che costituiscono i composti base delle cellule stesse. Tali sostanze, sono quasi sempre presenti naturalmente nelle vinacce in quantità sufficiente a garantire il fabbisogno del lievito.

1.4.2 Muffe

Le muffe sono funghi a portamento filamentoso, più o meno ramificato, i cui filamenti, detti ife, nel loro insieme formano il micelio.

La loro riproduzione avviene normalmente per mezzo di spore asessuate liberate a maturità nell'aria per originare a loro volta un micelio. Le spore vengono prodotte dai conidiofori che sono corpi fruttiferi visibili ad occhio nudo sotto forma di un leggerissimo feltro.

Il loro sviluppo è condizionato da diversi fattori:

- Temperatura: quella ottimale è compresa tra i 20 e i 30°C, ma vivono bene anche a temperature prossime agli 0°C.
- pH: preferiscono ambienti acidi, ma possono svilupparsi anche a valori di pH prossimi alla neutralità o superiori (pH 7-8).
- Ossigeno: le muffe sono microrganismi aerobi, necessitano di ossigeno in quantità variabile da specie a specie.
- Esigenze nutrizionali: attaccano sia molecole semplici sia molecole complesse come zuccheri, acidi, alcoli, sostanze azotate, polifenoli in genere, ecc.
- Resistenza all'alcol: spesso sono sufficienti tre gradi per inibirne lo sviluppo.

Lo sviluppo delle muffe inizia negli strati superficiali per poi continuare nelle zone più profonde ove siano presenti sacche d'aria.

L'azione delle muffe, oltre alla distruzione degli zuccheri e dell'alcol, provoca la produzione di sostanze maleodoranti a basso punto di ebollizione, definite comunemente con il termine di “odore e sapore di muffa” le quali passano poi al

distillato compromettendone le caratteristiche organolettiche. Per evitare lo sviluppo delle muffe è necessario il corretto insilamento delle vinacce, evitando infiltrazioni d'aria e riducendo al minimo i tempi d'insilamento, in quanto il periodo necessario al loro sviluppo non è brevissimo.

1.4.3 Batteri

I batteri che interessano le vinacce sono aerobi, aerobi facoltativi o anaerobi, possono essere bacilli e cocchi. Sono privi di riproduzione sessuata e si moltiplicano per scissione binaria.

I batteri oltre a produrre, acido lattico e acetico sono responsabili di alterazioni importanti a fini organolettici come quelle a carico della glicerina trasformata in acroleina ed alcol allilico nonché quelle relative agli acidi malico, tartarico, citrico e succinico, favoriti da valori di pH non troppo bassi (Odello *et al.*, 1997).

I batteri lattici si suddividono in omolattici o eterolattici; i primi producono quasi esclusivamente acido lattico dalla degradazione del glucosio, i secondi oltre all'acido lattico anche acido acetico, anidride carbonica ed etanolo.

Inoltre i batteri della fermentazione malo-lattica possono essere responsabili della produzione di acetoino e diacetile, collegata all'utilizzazione dell'acido citrico, presente nei vini (Zambonelli, 1998).

I batteri acetici sono dotati di un intenso metabolismo ossidativo per cui l'alcol etilico è ossidato ad acido acetico.

Il mezzo più efficiente per controllare questi microrganismi sembra essere rappresentato dal pH che a valori di 3.0 ÷ 3.2 risulta avere un buon effetto protettivo, soprattutto se associato all'impiego di anidride solforosa.

1.5 Conservazione della vinaccia

La produzione di una grappa di qualità dipende in larga parte dalle condizioni di conservazione e fermentazione della vinaccia, dal momento in cui ha lasciato il mosto, fino alla distillazione. Non essendo possibile sempre distillare immediatamente, sono stati sperimentati diversi sistemi di conservazione. Quelli maggiormente utilizzati (Odello *et al.*, 1997) sono:

Contenitori aperti in cemento; “vasconi” interrati o sopraelevati, chiusi su tre, quattro o cinque lati. Nei primi i camion scaricano direttamente nella “fossa” la vinaccia che viene poi sistemata e compressa manualmente. Nel secondo caso si utilizzano ruspe, sia per la stratificazione, sia per la compressione. Infine la vinaccia, per evitare il contatto con l’aria, viene ricoperta con teli di nylon bloccati con cumuli di sabbia. Questo sistema di insilamento è il più tradizionale ed il più utilizzato.

Sacchi di plastica; utilizzati sia per piccole partite di pregio sia in sostituzione di altre tecnologie, con lo scopo di conservare aroma e freschezza.

Contenitori cilindrici o cubici; di piccole dimensioni (150 ÷ 700 Kg) chiusi con coperchio o, nel caso dei più grandi, con film plastico ricoperto di sabbia.

Serbatoi in acciaio inox; dotati di dispositivi meccanici e automatizzati per il loro riempimento e svuotamento. Per tutte queste metodologie esistono diverse varianti e dimensioni adattate alle esigenze delle distillerie. Non si può comunque dimenticare che periodi di conservazione lunghi, possono indurre alterazioni della massa compromettendone la qualità. Per questo motivo possono essere effettuati a titolo preventivo alcuni trattamenti, come l’acidificazione e l’inoculo di lieviti selezionati, effettuati sulla vinaccia prima dell’insilamento.

1.6 Composizione della Grappa

Tutte le sostanze presenti in un distillato, ad eccezione dell’acqua e dell’alcol etilico sono definite “impurezze”. La *Grappa* ne è più ricca, se confrontata con altri distillati, e per questo motivo può essere considerata un prodotto “finito” anche senza la fase di invecchiamento.

Mediamente la sua composizione è la seguente (Tabella 1), De Rosa & Castagner, 1994:

Alcol metilico	740.00 g/hl di a.a.
Acidi volatili	72.80 g/hl di a.a.
Esteri	465.05 g/hl di a.a.
Aldeidi	106.48 g/hl di a.a.
Alcoli superiori	328.03 g/hl di a.a.

Tabella 1. Composizione media della *Grappa*.

L'aroma è il più importante carattere distintivo di un distillato: trova inizio nel vitigno e la fine nelle possibili aromatizzazioni con principi officinali aggiunti all'acquavite prima dell'imbottigliamento.

L'aroma "primario", definito anche aroma varietale, è legato al metabolismo dell'uva, varietà, tipo di terreno, clima e tecniche colturali; quello "secondario" è legato al metabolismo di lieviti e batteri durante la fermentazione alcolica e malolattica.

I composti responsabili di questa categoria di aromi vengono annoverati dalla chimica nelle famiglie degli alcoli, acidi, esteri, aldeidi, chetoni e contano centinaia di molecole differenti. Tipologia e rapporti sono in funzione sia della specie sia dei ceppi di lievito che hanno prodotto la trasformazione, delle condizioni di temperatura, acidità ed aerazione in cui hanno operato i lieviti e della contemporanea azione di altri microrganismi quali batteri e muffe.

Alcuni autori (Odello *et al.*, 1997) includono nella voce "aroma secondario" anche alcune sostanze responsabili di gradevoli sentori di liquirizia, che si formano dopo l'ammostatura, ma prima dell'inizio della fermentazione e quelle generate proprio durante la distillazione. Le grappe giovani che non derivano da vitigni a frutto aromatico sono grappe a prevalente aroma secondario.

L'aroma "terziario" si forma durante l'invecchiamento dell'acquavite in botti di legno, processo che amplia in modo considerevole il quadro aromatico di una grappa. Durante questa fase si assiste alla modificazione dei costituenti aromatici esistenti con la creazione di nuovi ed interessanti composti (soprattutto esteri) che si liberano in seguito a reazioni chimiche ed enzimatiche (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), ma anche aldeidi, lattoni e fenoli.

L'aroma "quaternario" si riferisce alle grappe aromatizzate in cui, generalmente, prevalgono le sostanze odorose apportate dal vegetale su quelle proprie dell'acquavite.

1.6.1 Aromi varietali

Gli aromi varietali sono quei composti che si trovano nell'uva ed impartiscono la tipica nota odorosa legata alla varietà. Queste molecole possono trovarsi già sensorialmente attive nel frutto e passare nella vinaccia, come avviene nel Moscato, per questo definita "varietà aromatica", oppure essere presenti come precursori aromatici inodori ed essere trasformati in molecole volatili dagli enzimi dei lieviti. Questo avviene per molte uve come Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc e diverse varietà

di Pinot. Tuttavia il termine “varietale” non significa che ogni varietà di uva ha uno specifico composto odoroso, infatti le stesse molecole ed i loro precursori si possono trovare in varietà di uve differenti oltre che in altri frutti e piante; la peculiarità aromatica nasce dalle infinite combinazioni di composti presenti in concentrazioni diverse.

Le molecole aromatiche più studiate nelle uve di *Vitis vinifera* sono i terpeni nelle forme libere e glicosilate, i norisoprenoidi prodotti dalla rottura chimica o enzimatica dei carotenoidi e le metossipirazine che impartiscono la nota erbacea caratteristica del Cabernet Franc e Sauvignon (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

1.6.2 Terpeni

I terpeni sono molecole ampiamente diffuse nel regno vegetale; i composti odorosi appartenenti a questa famiglia sono i monoterpeni (composti con 10 atomi di carbonio) e i sesquiterpeni (15 atomi) formati da 2 e 3 isopreni, rispettivamente. I monoterpeni (Figura 2), possono presentarsi sotto forma di semplice catena carboniosa (limonene), come aldeidi (linalale, geraniale), alcoli (linalolo, geraniolo), acidi (acidi linalico e geranico) ed esteri (linalil e geranil acetato).

Nelle uve sono stati identificati circa 40 monoterpeni di cui le forme alcoliche come il linalolo, il geraniolo e il citronellolo, responsabili della nota floreale, sono tra le più odorose.

Anche se la soglia di percezione di queste molecole risulta piuttosto bassa, l'impatto olfattivo dei composti terpenici è sinergico. Accanto ai terpeni odorosi esistono le forme non volatili presenti in forma glicosilata in cui l'aglicone è legato a zuccheri quali il glucosio, l'arabinosio, il ramnosio e l'apiosio.

Tutte le varietà di uva hanno glicosidi, ma quelle del Moscato ne presentano la più alta concentrazione.

Nelle bucce dell'uva si trova la più alta concentrazione di monoterpeni liberi e glicosilati rispetto alla polpa o al succo, mentre la proporzione tra le due forme, dipende dalla varietà dell'uva.

I glicosidi sono molto più solubili in acqua rispetto ai relativi agliconi e svolgono la funzione di trasporto ed accumulo di monoterpeni nelle varie parti della pianta come foglie e germogli dove furono identificate la prima volta.

Alcune molecole terpeniche presenti nelle varietà “floreali” e nel Sauvignon.

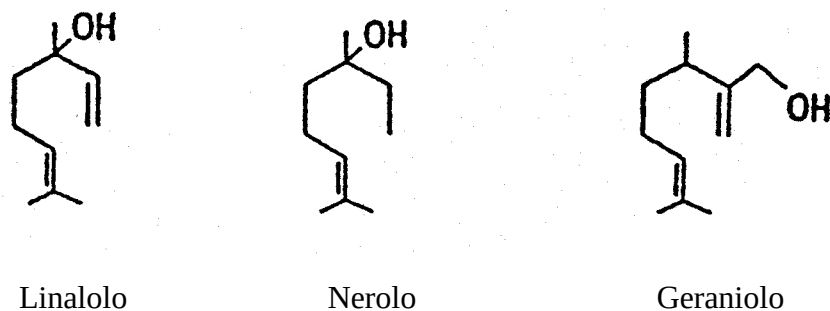


Figura 2. Monoterpeni.

1.6.3 Aromi di fermentazione

La cellula di lievito utilizza il nutrimento mediante meccanismi anabolici e catabolici, attraverso processi di ossido-riduzione mediati da deidrogenasi che utilizzano rispettivamente NADH e NAD come cofattori.

La formazione di NADH e la sua ossidazione a NAD sono sempre mantenuti in equilibrio nella cellula per evitare l'arresto della glicolisi. La formazione di molecole aromatiche quali esteri, acidi grassi ed alcoli superiori è legata al metabolismo della cellula in quanto questi composti svolgono specifiche funzioni al suo interno (Lambrechts & Pretorius, 2000).

1.6.4 Acidi grassi

Benchè il 90% dell'acidità volatile del vino sia rappresentata dall'acido acetico che non deve superare la concentrazione di $1 \div 1.5$ g/l, nelle bevande fermentate sono presenti altri acidi grassi che conferiscono importanti caratteristiche olfattive, anche se presenti in piccole quantità.

Quelli a corta catena come l'acido acetico, il propanoico ed il butanoico sono prodotti della fermentazione, mentre quelli a lunga catena (C 16 e C 18) sono precursori essenziali nella sintesi di molti composti lipidici della cellula di lievito e non si trovano mai in forma libera, ma sempre legati a steroli o glicerolo. Questi ultimi si trovano difficilmente nei vini, mentre sono presenti nei prodotti distillati ottenuti in presenza di fecce di lievito.

Gli acidi grassi volatili a media catena (C 8, C 10 e C 12) vengono prodotti dai lieviti come intermedi nella sintesi di quelli a lunga catena, piuttosto che dal loro catabolismo

ed assieme ai loro esteri sono componenti naturali delle bevande alcoliche. Possono agire come inibitori potenziali della fermentazione alcolica e questa capacità è direttamente proporzionale alla loro solubilità che dipende dal contenuto di etanolo (Lambrechts & Pretorius, 2000).

La quantità ed il tipo di acidi grassi rilasciati durante la fermentazione nel mezzo di crescita dipendono dal ceppo di lievito e da fattori chimici e fisici quali pH, temperatura, ossigeno e presenza di nutrienti che possono essere controllati al fine di ottenere le caratteristiche sensoriali desiderate.

1.6.5 Esteri

Gli esteri sono dei composti molto importanti per la qualità aromatica dei prodotti fermentati, rappresentano infatti un gruppo di molecole volatili, liberate durante la fermentazione come metaboliti secondari della degradazione degli zuccheri, che impartiscono i più piacevoli aromi alle bevande alcoliche (Peddie, 1990; Fujii *et al.*, 1994), specialmente a quei prodotti derivanti da varietà di uva considerate neutre (Marais & Pool, 1980).

Gli esteri sono stati classificati mediante criteri che si avvalgono di metodi analitici e valutazione sensoriale. Nel primo caso sono stati suddivisi in funzione del punto di ebollizione in 3 frazioni: quella leggera, costituita da molecole che eluiscono prima dell'alcol isoamilico, rappresentata da esteri etilici, isobutilici e isoamilici di acidi grassi a corta catena; quella intermedia compresa tra l'eluizione dell'etil caproato e l'alcol fenilico costituita da esteri etilici dell'acido caprilico e caprico; quella pesante che comprende tutti gli esteri dell'acido tetradodecanoico (Leaute, 1990). Un altro criterio di classificazione si basa sulla polarità di questi composti, che vengono così suddivisi in esteri apolari e polari. I primi presentano una bassa soglia di percezione e, ad eccezione dell'etil acetato, conferiscono note fruttate all'aroma dei prodotti fermentati. Sono inoltre presenti in minor concentrazione rispetto a quelli polari e comprendono l'etil acetato, l'isoamil acetato, l'etil octanoato, l'etil esanoato, l'etil propanoato, l'etil butanoato ed il 2-fenilacetato. I secondi invece non contribuiscono tanto alla qualità aromatica quanto al "corpo" delle bevande alcoliche (Boulton *et al.*, 1995).

Gli esteri maggiormente presenti nei prodotti fermentati sono gli acetati degli alcoli superiori quali: l'isoamil acetato, l'isobutil acetato e gli etil esteri degli acidi grassi tra

cui ricordiamo l'etil butanoato, esanoato, ottanoato, decanoato e dodecanoato (Thurston *et al.*, 1981; Marais, 1990; Fujii *et al.*, 1994).

1.6.6 Alcoli superiori

Gli alcoli superiori possono essere alifatici come il propanolo, l'alcol isobutilico e isoamilico o aromatici come l'alcol feniletilico ed il tirosolo. L'alcol isoamilico è il principale alcol superiore, tuttavia la quantità ed il tipo di questi composti varia considerevolmente in funzione delle tecniche di viticoltura e dal ceppo di lievito, rivestono inoltre notevole importanza la quantità di etanolo la temperatura di fermentazione, il pH del mosto, la varietà ed il grado di maturazione dell'uva, il contatto con le bucce e la presenza di amino acidi nel mezzo.

Gli alcoli superiori sono importanti precursori di esteri e gli esteri degli alcoli superiori impartiscono caratteristiche aromatiche molto piacevoli alle bevande fermentate.

Questi composti sono prodotti dai lieviti durante la fase esponenziale della fermentazione alcolica attraverso la conversione degli aminoacidi presenti nel mezzo oppure sintetizzati *ex novo* a partire dagli zuccheri.

Con l'insilamento solo due alcoli superiori subiscono un incremento nel tempo: l'1-propanolo e il 2-butanolo. Quest'ultimo è caratteristico della grappa in quanto nè la vinaccia all'arrivo in distilleria, nè il vino lo contengono. Per questo motivo, secondo alcuni autori (De Rosa & Castagner, 1994) questa molecola costituisce una chiave di riconoscimento della grappa rispetto agli altri distillati. Il 2-butanolo si sviluppa ad opera di batteri anaerobi negli strati più protetti dall'ossigeno. Le concentrazioni vanno dai 20 mg/100 ml a.a. dopo 20 giorni d'insilamento, fino a 500-1000 mg/100 ml a.a. per periodi più lunghi.

1.7 Distillazione

In fisica, per distillazione, si intende quel processo che consente la separazione di due composti con volatilità diversa, mediante trasformazione dei medesimi in vapore e la loro successiva condensazione.

Per quanto riguarda la distillazione della vinaccia, le cose diventano un po' più complesse, in quanto non troviamo solamente due sostanze a volatilità diversa, bensì

più di un centinaio (De Rosa & Castagner, 1994). Nel caso della *Grappa*, la distillazione diventa un'operazione che consente di estrarre dalla vinaccia i componenti volatili, concentrare la frazione alcolica e le sostanze aromatiche di pregio, separando nel contempo quelle indesiderabili.

Le difficoltà che si incontrano dipendono dal fatto che acqua e alcol sono miscibili, costituendo una miscela azeotropica e di conseguenza la separazione è funzione non solo della temperatura di ebollizione, ma dell'affinità delle sostanze per il solvente in cui sono sciolte (acqua e alcol rispettivamente).

La distillazione della vinaccia comporta perciò fenomeni di trascinamento di alcuni componenti indipendentemente dalle leggi fisiche dell'evaporazione, variazione della composizione della fase liquida e di quella vapore ed una maggiore o minore solubilità delle sostanze a prescindere dal loro punto di ebollizione.

Ne sono un esempio gli studi condotti sull'argomento da Barbet (Meloni, 1953-1958) che definendo i coefficienti K ipotizza il comportamento in distillazione delle diverse sostanze volatili al variare della % alcolica. L'alcol metilico con $K=1$, in quanto presente nella stessa concentrazione sia nel liquido sia nei vapori, risulta difficilmente separabile in prima distillazione dall'alcol etilico e quindi rende spesso necessario il ricorso alla colonna di demetilazione.

La *Grappa* può essere distillata in modo continuo e discontinuo, due sistemi che differiscono non tanto per il metodo di distillazione quanto per il modo in cui si ha l'approvvigionamento delle flemme (il liquido a bassa gradazione alcolica) che arriva alla colonna. I criteri di scelta dell'impianto sono molteplici tenendo conto della quantità e tipi di vinacce da lavorare, dal tipo di grappa che si vuol ottenere, dai costi di produzione. L'elemento chiave del sistema è la colonna di distillazione, un cilindro suddiviso in segmenti da piatti forati che recano su di essi dei tubicini coperti da campanelle; i vapori alcolici nella loro tendenza ascensionale passeranno attraverso i tubicini del primo piatto, lambiranno le campanelle e cercheranno di risalire la colonna superando un piatto dopo l'altro. Ogni piatto può essere considerato un alambicco a se stante che riceve calore da quello sottostante, emette vapori la cui composizione è funzione del liquido in esso contenuto e fornisce calore per l'evaporazione di quanto liquefatto nel piatto soprastante. A livelli più alti troveremo perciò la maggiore concentrazione di alcol ed elementi aromatici bassobollenti. Inoltre il diametro della colonna, la distanza tra i piatti, l'altezza del liquido nel piatto e la velocità dei vapori rendono problematico standardizzare il prodotto finale, soprattutto se si valuta

organoletticamente. Infatti lungo il tragitto in colonna le molecole delle diverse sostanze volatili reagiscono originando nuovi composti odorosi come i furani derivanti dai terpeni. Grandi oscillazioni nella qualità dell'acquavite si hanno in caso di sosta dell'impianto per intervalli più o meno lunghi tra due distillazioni o di forti variazioni compositive dei vapori alcolici in entrata, come accade nel caso di alambicchi discontinui.

1.8 Attività enzimatiche

1.8.1 Esterasi (EST, E.C. 3.1.1.x)

Le esterasi sono enzimi piuttosto diffusi in natura, appartenenti alla classe delle idrolasi che idrolizzano i legami estere in presenza di acqua.

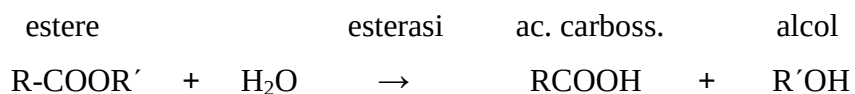
Le esterasi possono essere suddivise, in base alla classificazione proposta dalla International Union of Biochemistry (IUB), in molte sottoclassi corrispondenti all'affinità per uno specifico acido esterificato, presente nella molecola di substrato:

- IDROLASI DEGLI ESTERI DI ACIDI CARBOSSILICI
- IDROLASI DEI TIOESTERI
- IDROLASI DEI MONOESTERI FOSFORICI (fosfatasi)
- IDROLASI DEI DIESTERI FOSFORICI
- IDROLASI DEI MONOESTERI TRIFOSFORICI
- IDROLASI DEGLI ESTERI SOLFORICI
- IDROLASI DEI MONOESTERI DIFOSFORICI

Quelle di interesse enologico appartengono alla prima classe che può essere ulteriormente suddivisa (Dell'Oro *et al.*, 1992):

- 1) *idrolasi degli esteri degli acidi carbossilici*, dette anche carbossilesterasi o B esterasi, che hanno come substrato gli esteri carbossilici di alcoli alifatici o aromatici e sono inibite dai composti organofosforati in bassa concentrazione;
- 2) *idrolasi degli esteri arilici*, dette anche arilesterasi o A esterasi, che hanno come substrato il fenilacetato e non sono inibite dai composti fosforati;
- 3) *idrolasi degli esteri dell'acido acetico*, dette anche acetilsterasi o C esterasi, che hanno come substrato gli esteri dell'acido acetico e non sono inibite dai composti fosforati, ma dall'EDTA che complessa reversibilmente gli ioni Ca^{2+} , coinvolti nella loro attività catalitica.

Le esterasi catalizzano la seguente reazione:



È stato proposto come modello generale del sito attivo di molte esterasi, la seguente catena aminoacidica: acido aspartico (acido glutammico) - serina - glicina (alanina) ed acetile legato ad un residuo di serina.

Le esterasi seguono generalmente la cinetica di Michaelis-Menten: questo vuol dire che la velocità di reazione non aumenta indefinitamente con l'incremento di concentrazione del substrato, ma che giunge ad una velocità di reazione massima che si realizza quando tutti i siti attivi dell'enzima sono saturati dal substrato e quindi, un ulteriore aumento della concentrazione di quest'ultimo, non provoca alcun aumento della velocità di reazione (Dell'Oro *et al.*, 1992).

Gli acidi carbossilici e gli acidi grassi, insieme ai loro esteri, costituiscono una classe di composti di fondamentale importanza nella formazione dell'aroma di fermentazione di bevande quali vino, birra e distillati. Gli esteri hanno soglie olfattive molto basse, con aromi caratteristici anche quando sono presenti in concentrazioni di poche parti per milione. Molte bevande alcoliche prodotte per distillazione, facilmente distinguibili all'olfatto e al gusto, analizzate chimicamente hanno mostrato scarse differenze nella loro composizione chimica, sono state rilevate le stesse sostanze aromatiche presenti, solo, in concentrazioni differenti. Composti come acetato di etile, di isoamile, di isobutile, etilcaproato ed etilcaprato, butirrato e valerato di etile hanno un ruolo fondamentale nella formazione del bouquet di una bevanda alcolica, anche se, presi singolarmente, non superano la soglia olfattiva.

1.8.2 β -glucosidasi (β G, E.C. 3.2.1.21)

Gli aromi glico-coniugati spesso si presentano sotto forma di diglicosidi, nei quali l'aglicone odoroso è legato ad un glucosio a sua volta legato ad un'altro glicoside (ramnosio, arabinosio, apiosio). Secondo numerose ricerche (Günata *et al.*, 1988), il rilascio dell'aroma, per via enzimatica, è un meccanismo che avviene in due tappe nelle quali una α -L-ramnosidasi, una α -L-arabinosidasi o una β -D-apiosidasi effettuano la rottura del primo disaccaride, lasciando poi alla β -glucosidasi il compito di liberare

l'aglicone odoroso (Figura 3). Esiste una scarsa documentazione relativa alla localizzazione di questi enzimi nella cellula del lievito.

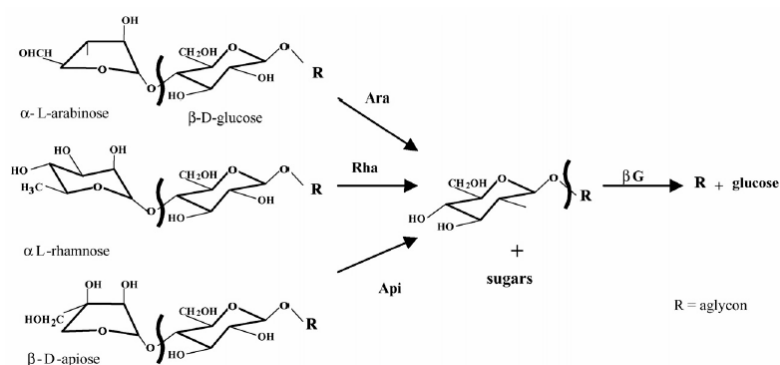


Figura 3. Sequenza del meccanismo di azione delle glicosidasi (Palmeri & Spagna, 2007).

Alcune ricerche focalizzano l'attenzione sugli enzimi escreti dalla cellula e presenti nel mezzo di crescita, poiché sarebbero quelli in grado di operare sul substrato e quindi sul precursore aromatico del mezzo. Tale attività esocellulare potrebbe essere il risultato di una localizzazione a livello della parete cellulare o di una escrezione attiva o post mortem, ma nulla esclude la possibilità di una concomitanza di questi fattori. Poiché il pH ottimale di questi enzimi è vicino a 5, la loro influenza diretta sulla valorizzazione del potenziale odoroso terpenico delle vinacce è teoricamente limitata. Per quanto riguarda i fattori che possono avere effetti inibitori sulla β -glucosidasi del lievito, la presenza di 100 g/l di glucosio e 15° alcolici ne riducono l'attività rispettivamente del 20% e 10%, mentre una quantità di anidride solforosa fino a 50 mg/l non ha alcun effetto (Delcroix *et al.*, 1994; Cordonnier *et al.*, 1989).

1.8.3 Pectin metilesterasi (PME, E.C. 3.1.1.11)

La pectin metilesterasi è un enzima che gioca un ruolo molto importante nella fisiologia e nel metabolismo della maggior parte delle piante superiori durante la crescita cellulare, ma è prodotto anche da diversi microrganismi, soprattutto patogeni, come *B. cinerea* (Lee *et al.*, 1979). La PME agisce sui polisaccaridi strutturali della parete cellulare vegetale e catalizza selettivamente l'idrolisi di gruppi metilici in posizione 6 dell'acido galatturonico, liberando metanolo (Figura 4) e rendendo la pectina altamente

polimerizzata, suscettibile di ulteriore depolimerizzazione grazie alle poligalatturonasi (PG). Questa degradazione provoca la perdita di consistenza dei frutti durante la maturazione.

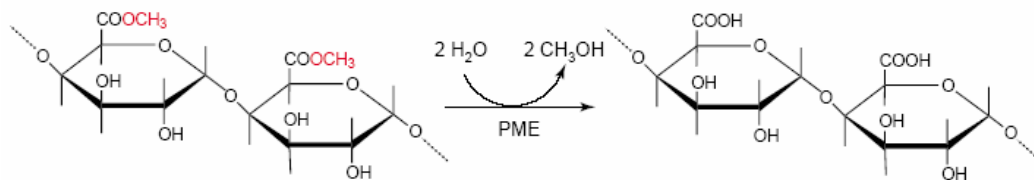


Figura 4. Meccanismo di idrolisi della pectin metilesterasi.

Diversi autori (Micheli, 2001; Barnavon *et al.*, 2001) hanno dimostrato che nella maggior parte dei frutti si distinguono due o più isoforme di PME che differiscono fra loro per massa molecolare, punto isoelettrico (pI), temperatura e pH ottimale. Lo studio di queste isoforme, ricavate dalle pareti vegetali, ha permesso di stabilire che la maggior parte presenta pH neutro o alcalino (Bordenave, 1996), anche se sono state individuate isoforme con pH acido, probabilmente solo debolmente adsorbite sui componenti della parete, ma comunque molto importanti nella fisiologia dei vegetali (Ren & Kermode, 2000). Le diverse isoforme sono codificate da una famiglia multigenica (Micheli, 2001). Recentemente il sequenziamento del genoma di *Arabidopsis* ha contribuito all'identificazione in questa specie di 67 geni PME correlati. I geni PME codificano pre-pro proteine che contengono peptidi considerati marcatori di PME. La pro-regione è richiesta per proteine che hanno come bersaglio il reticolo endoplasmatico. La pro-PME viene secreta nell'apoplasto attraverso i serbatoi cis, mediale e trans dell'apparato del Golgi, nella parete cellulare si trova solo la parte "matura" della PME, senza la pro-regione (Micheli, 2001).

Visto che le PME estratte da pareti non hanno pro-regioni, la scissione di questa porzione si verificherebbe prima o successivamente alla secrezione nell'apoplasto. Sul ruolo delle pro-regioni sono state formulate diverse ipotesi, le più accreditate dimostrano che queste proteine intervengono nelle funzioni biologiche della PME, in particolare queste proteine inibirebbero l'attività enzimatica della parte "matura" della PME durante la secrezione nell'apoplasto, impedendo la prematura demetilesterificazione delle pectine, prima della loro inserzione nella parete. Dopo la loro integrazione nella parete, le PME "mature" hanno diversi meccanismi d'azione a

seconda che agiscano su pectine presenti in piante o in microrganismi (Markovic & Kohn, 1984). Nel primo caso l'enzima, si tratterebbe di isoforme alcaline, agisce linearmente sugli omogalatturonani determinando l'aumento di gruppi carbossilici liberi che possono interagire con i cationi presenti nel mezzo, in particolare con il calcio. In seguito a questa reazione si formano legami crociati fra catene adiacenti di acido galatturonico de-esterificato originando un gel pectico con struttura tipo "egg-box". Nei funghi e microrganismi, l'enzima, probabilmente le isoforme acide di PME agiscono secondo un meccanismo random (Micheli, 2001), la demetilesterificazione degli omogalatturonani provoca la liberazione di protoni che promuovono l'azione delle endopoligalatturonasi (endo-PG) che contribuiscono a degradare la parete. Recenti studi hanno dimostrato che l'attività PME è influenzata dal pH della soluzione e dal livello di metilesterificazione della pectina: si è osservato, infatti, che alcune isoforme possono agire casualmente a pH acido, ma linearmente a pH alcalino; alcune si rivelano più efficaci di altre su pectine altamente esterificate. Da numerosi esperimenti (Lee *et al.*, 1979; Barnavon *et al.*, 2001) condotti in diverse piante si è ricavato che l'optimum di pH per questo enzima è compreso tra 7 e 7.5, inoltre nelle varietà d'uva Concorde (Lee *et al.*, 1979) l'attività aumenta rapidamente passando da pH 5 a 7.5 e decresce a valori superiori. Il medesimo comportamento è stato riscontrato anche in altre specie vegetali come agrumi e pomodoro (Kertesz, 1938; Guyer *et al.*, 1956). Nei microrganismi e in particolare nei funghi è interessante osservare come l'optimum di pH scenda a valori compresi fra 4 e 4.5.

L'attività di questo enzima risulta influenzata anche dalla concentrazione dei cationi presenti nella soluzione che possono anche modificare l'affinità per il substrato. I cationi trivalenti si sono rivelati più efficaci dei bivalenti a loro volta migliori dei monovalenti (Micheli, 2001). Di conseguenza le variazioni nel contenuto naturale di cationi organici ed inorganici può influenzare l'attività PME, la stabilità e la propensione a indurre aggregazioni di pectina. È stato osservato anche come l'attività PME risulti molto influenzata dalle cultivar considerate, anche perché le pareti primarie delle cellule degli acini sono costituite da un insieme comune di polisaccaridi strutturali, la cui differente distribuzione è una caratteristica varietale.

Nell'uva il grado di metilesterificazione degli omogalatturonani può variare dal 40 all'80% (Lecas & Brillouet, 1994) a seconda di cultivar, stadio di sviluppo e tessuto preso in esame; le specie di *Vitis Vinifera* hanno minor attività PME di quelle di *Vitis Labruscana* e le uve rosse presentano maggior attività rispetto a quelle bianche. Di

conseguenza i vini bianchi contengono meno metanolo dei vini rossi e dei mosti fermentati in presenza delle bucce in quanto ampie porzioni di PME e di sostanze pectiche sono localizzate principalmente nella buccia dell'acino (Lee *et al.*, 1975).

1.9 Inibizione della PME

È noto che per inattivare le PME vegetali endogene possono essere utilizzati trattamenti fisici ad alte temperature e pressione (Parish, 1998). Questi processi sono però complessi e costosi sotto il profilo del consumo energetico ed incidono negativamente sulla qualità del prodotto finale. Inoltre tali processi non sono completamente efficienti poichè esistono isoforme delle PME estremamente termostabili che possono rimanere attive anche dopo severi trattamenti termici. Nel brevetto US 5,053,232 (Balestrieri *et al.*, 1993) e nel brevetto italiano RM2003A000346 (Bellincampi *et al.*, del 2003) è descritto un inibitore proteico delle PME (di seguito indicato anche come PMEI) che permette di superare i limiti derivanti da questi processi fisici per l'inattivazione delle pectinesterasi. Questo inibitore di natura proteica derivato dal kiwi (*Actinidia chinensis*) o ottenuto per via ricombinante è capace di inibire in modo particolare PME vegetali. L'inibitore naturale di kiwi è stato ampiamente caratterizzato biochimicamente, ha massa molecolare di circa 16 kDa ed è stata determinata la sua completa sequenza aminoacidica.

1.10 Valutazione dell'imbrunimento enzimatico

Aspetto, gusto, consistenza e valore nutrizionale sono le caratteristiche degli alimenti considerate più importanti dal consumatore. Nella valutazione dell'aspetto, il colore è sicuramente uno dei primi attributi ad essere valutato. Può derivare da pigmenti naturalmente presenti negli alimenti quali clorofilla, carotenoidi e antociani o da altri risultanti da reazioni d'imbrunimento enzimatico o non enzimatico.

Se l'imbrunimento non enzimatico è direttamente collegato alla "storia tecnologica" del prodotto, l'imbrunimento enzimatico è strettamente connesso alla natura del vegetale, ovvero alla presenza di enzimi ossidasici (Figura 5).

Si tratta di una delle reazioni più importanti e più studiate nei prodotti di origine vegetale e nei crostacei per gli effetti negativi sulla qualità del prodotto fresco o trasformato (Figura 6).

È catalizzata dall'enzima polifenolossidasi, conosciuto anche come fenolossidasi, fenolasi, monofenolo ossidasi, difenolo ossidasi e tirosinasi. Quest'ultimo presente anche in alcune specie batteriche del genere *Streptomyces* (Claus & Decker, 2006).

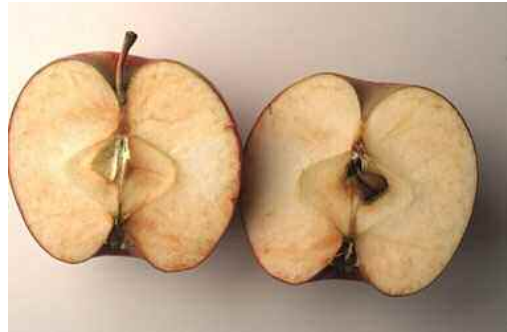


Figura 5. Imbrunimento enzimatico nelle mele.

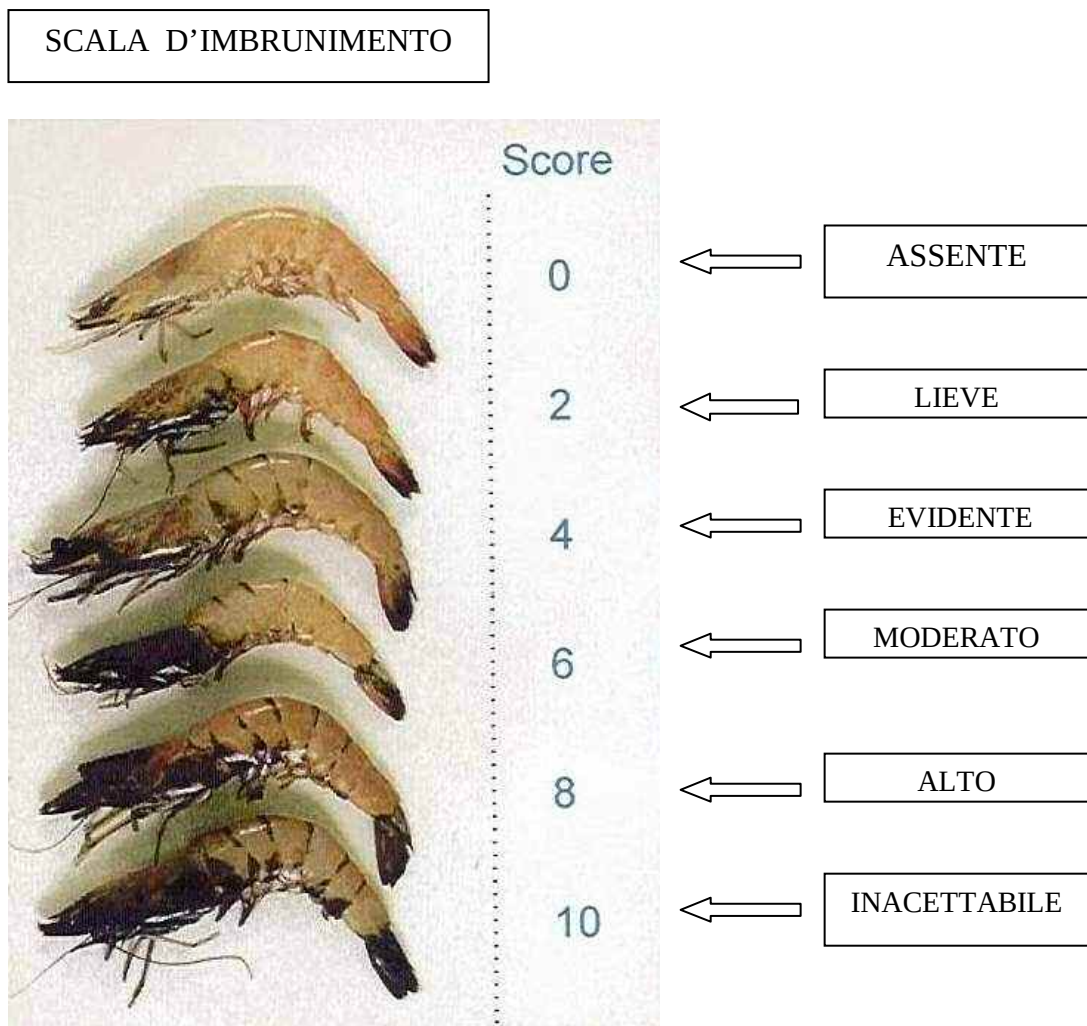


Figura 6. Scala di imbrunimento (Dr. W. S. Otwell, University of Florida).

Alcuni autori riportano che i prodotti dell'attività polifenolossidasi, i chinoni, in grado di reagire con altri composti, quali aminoacidi, fenoli, zuccheri possono produrre “*off-flavours*” (Morton & McLeod, 1986). Le interazioni dei chinoni con le proteine possono ridurre la digeribilità ed il valore nutrizionale inducendo cambiamenti nelle loro proprietà organolettiche. La presenza dell'enzima nei vegetali influenza la qualità del prodotto finale e conseguentemente l'accettabilità da parte del consumatore (Mayer & Harel, 1991).

L'imbrunimento non sempre è associato solo a perdite e quindi a costi da sostenere.

Nel tè l'ossidazione enzimatica delle sostanze polifenoliche è una caratteristica molto positiva (Coultate, 2002). Nei semi di cacao, così come nel caffè l'attività della PPO è essenziale per il colore e la qualità finale del prodotto (Mayer & Harel, 1991).

La PPO è inoltre responsabile del tipico colore marrone dell'uva passa, datteri e fichi.

La PPO, enzima endogeno catalizza la produzione di chinoni dai costituenti fenolici, composti altamente instabili in grado di polimerizzare e condurre alla formazione di melanine, sostanze dotate di attività antibatterica e antifungina. Sono gli *o*-chinoni che interagendo con i gruppi ossidrilici presenti negli enzimi fungini, provocano la riduzione della capacità dei funghi stessi di penetrare i tessuti eventualmente danneggiati. La relativa resistenza alle malattie fungine di diverse varietà di cipolla e mela è stata correlata con la loro attività fenolasica e con il loro elevato contenuto di chinoni (Coultate, 2002).

È stato stimato che il 50% delle perdite dei prodotti ortofrutticoli è collegato all'imbrunimento enzimatico (Whitaker & Lee, 1995), di conseguenza è aumentato l'interesse nello studio e nel controllo della PPO. Limitare tale fenomeno nel post-raccolta è molto difficile, ma necessario per mantenere il valore economico e nutrizionale del prodotto (Marshall *et al.*, 2000).

1.11 Polifenolossidasi (PPO, E.C. 1.14.18.1, E.C. 1.10.3.1)

La fenolossidasi comprende essenzialmente due tipi di enzimi, *o*-difenolo ossidasi (catecolo ossidasi, tirosinasi, fenolasi e polifenolossidasi,) e *p*-difenolo ossidasi o laccasi, presente soprattutto nei funghi. Entrambe sono delle ossidoreduttasi, ma si differenziano sulla base delle proprietà molecolari e dei substrati utilizzati (Mayer & Harel, 1991).

L'enzima catalizza due distinte reazioni coinvolte nell'ossidazione dei composti fenolici, in entrambe l'ossigeno molecolare è utilizzato come co-substrato:

- 
- MONOFENOLO *o*-DIFENOLO

- Oc1ccccc1O.O=[O]>>O=C1C=CC(=O)C=C1.O
- o*-DIFENOLO *o*-BENZOCHINONE

39

I chinoni sono composti instabili e suscettibili a nuove condensazioni con composti fenolici, flavonoidi, aminoacidi e proteine per dare origine a pigmenti il cui colore varia dal giallo al bruno (Rapeanu *et al.*, 2006).

Nonostante la presenza di entrambe le attività nelle piante, il rapporto tra la cresolasica e la catecolasica è solitamente di 1:10 o 1:40 (Nicolas *et al.*, 1994).

1.12 Le polifenolossidasi dell'uva e del vino

Si tratta di un enzima endogeno dell'uva, con attività catecolasica e cresolasica. È localizzato prevalentemente a livello dei cloroplasti, mitocondri e in minor misura nella frazione solubile della cellula, questa condizione ne determina la difficoltà di estrazione e di studio.

L'attività della PPO può essere misurata in presenza di substrati specifici, quali il catecolo o il 4-metil catecolo, attraverso la misura spettrofotometrica della variazione d'assorbanza a $400 \div 420$ nm o per mezzo della determinazione dell'ossigeno consumato con metodo polarografico (elettrodo di Clark).

Una delle caratteristiche più importanti della PPO dell'uva è la presenza di diverse isoforme enzimatiche visualizzabili con tecniche elettroforetiche e variabili a seconda della varietà, del metodo di estrazione e purificazione utilizzati.

L'optimum di pH è compreso nell'intervallo da $5 \div 7$ a seconda del vitigno e dello stadio fisiologico dell'uva. La massa molecolare varia con le isoforme e quella predominante ha un valore di $55 \div 59$ kDa.

Nel sito attivo è presente uno ione Cu^{2+} e la composizione aminoacidica è ricca di acido aspartico, acido glutammico, prolina e alanina. L'attività enzimatica è elevata nei frutti verdi e più bassa nell'uva sovramatura, con un picco alla maturazione fisiologica. L'alterazione della struttura della bacca durante i trattamenti pre-fermentativi in presenza d'aria, comporta un aumento dell'attività, in relazione ad un aumento delle forme solubili dell'enzima. Questo associato all'assenza di SO_2 , sostanza antiossidante impiegata tradizionalmente nella vinificazione, porta all'imbrunimento intenso del mosto. L'aumento della pressione esercitata in fase di pigiatura comporta un incremento considerevole sia dell'attività solubile che totale (Flanzy, 1998).

La solfitazione a seconda delle dosi utilizzate e del tenore di SO_2 libera, induce una diminuzione dell'attività conseguente all'inattivazione dell'enzima. L'aggiunta di bentonite al mosto porta alla diminuzione dell'attività solubile.

Nel corso della vinificazione l'attività della PPO diminuisce in relazione alla formazione di alcool, alla diminuzione di pH e alla precipitazione delle proteine.

1.13 Controllo dell'imbrunimento nell'industria alimentare

L'imbrunimento enzimatico non avviene nelle cellule integre in quanto le sostanze polifenoliche localizzate a livello dei vacuoli sono separate dall'enzima presente nel citoplasma. Nel momento in cui il tessuto viene danneggiato attraverso il taglio o in seguito a danni meccanici, substrato ed enzima reagiscono con conseguente formazione di pigmenti bruni, caratterizzando negativamente sia le caratteristiche organolettiche che biochimiche del prodotto stesso.

Molti studi si sono focalizzati sulla prevenzione e inibizione dell'attività polifenolossidasi.

Tutte le tecniche hanno lo scopo di eliminare uno dei componenti essenziali della reazione: O₂, enzima, ione Cu²⁺ o substrato e si possono suddividere in fisiche e chimiche.

1.13.1 Mezzi fisici

Il *blanching*, è un metodo molto efficace nel controllo dell'imbrunimento della frutta e dei vegetali surgelati. La temperatura applicata va dai 70 ai 100°C per 3 min, anche se dipende direttamente dal tipo di PPO. In generale, l'esposizione dell'enzima alle temperature sopra riportate ne comporta la sua inattivazione o denaturazione (Vámos-Vigyázó, 1981).

Nella refrigerazione, l'utilizzo di temperature inferiori ai 7°C, portano ad inibire parzialmente la polifenolossidasi, ma non ad una sua completa inattivazione.

Il congelamento a temperature di -18°C o inferiori, è spesso applicato agli alimenti conservati per lunghi periodi.

Tappel (1966) propose che i soluti presenti alle alte concentrazioni, come sali e zuccheri fungono da inibitore della PPO. Fennema (1975) attribuisce l'effetto protettivo del congelamento ad un cambiamento del pH, in quanto modificazioni nella concentrazione e composizione del tampone possono causare cambiamenti nel pH e conseguentemente nell'acidità, per un aumento della mobilità degli ioni idrogeno in ghiaccio, comparata con quella in acqua. Il congelamento può però causare anche cambiamenti nella

“*texture*” e freschezza di un alimento, oltre a provocare una delocalizzazione di certi enzimi. La disidratazione si basa sulla rimozione dell’acqua dal prodotto per sublimazione o attraverso l’utilizzo di sostanze igroscopiche. Attraverso la disidratazione l’enzima viene parzialmente inattivato, ma non denaturato.

L’uso di radiazioni ionizzanti (raggi UV, raggi γ , raggi x) ha come scopo l’aumento della “*shelf-life*” del prodotto attraverso l’inattivazione degli enzimi.

Il trattamento ad alte pressioni, noto anche come “*High Pressure Processing (HPP)*”, prevede l’utilizzo di 500 ÷ 700 atm. La denaturazione degli enzimi è causata da riarrangiamenti o rotture dei legami non-covalenti (legami idrogeno, interazioni idrofobiche, legami ionici) della struttura terziaria delle proteine. La perdita dell’attività catalitica dell’enzima in seguito all’applicazione delle alte pressioni, varia a seconda dell’enzima, della natura del substrato, della temperatura e delle durata del processo (Cheftel, 1992).

La PPO è molto resistente alle alte pressioni. Weemaes *et al.* (1998) riportano pressioni di 600, 700, 800, 900 MPa per l’inattivazione della PPO da mela, uva, avocado e pera a temperatura ambiente (25°C).

L’efficacia del “*Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂)*” nella conservazione degli alimenti, è dovuta al fatto che in seguito alla dissoluzione in acqua, la CO₂ ad elevate pressioni produce acido carbonico, efficace nella riduzione temporanea del pH (Figura 7).



Figura 7. Uva non trattata con SC-CO₂ e uva trattata.

L’ultrafiltrazione è una “*membrane separation technology*” utilizzata nella stabilizzazione del colore dei vini bianchi e dei succhi di frutta (Sims *et al.*, 1990, Goodwin & Morris, 1991) riportano la possibilità dell’utilizzo dell’ultrafiltrazione in alternativa alla solfitazione per il controllo dell’imbrunimento enzimatico.

L'ultrasonificazione prevede l'uso combinato del calore e degli ultrasuoni per l'inattivazione dell'enzima.

1.13.2 Mezzi chimici

Agenti riducenti

Gli agenti riducenti svolgono un ruolo molto importante nella prevenzione dall'imbrunimento enzimatico attraverso la riduzione degli *o*-chinoni a difenoli incolori o reagendo irreversibilmente con *o*-chinoni per formare composti incolori. Tra questi si trovano anche gli agenti solfitanti, quali il diossido di zolfo (SO₂) conosciuto anche come anidride solforosa e altre forme di zolfo inorganico in grado di liberare SO₂ alle condizioni di utilizzo.

SO₂: diossido di zolfo

SO₃²⁻: solfito

HSO₃⁻: bisolfito

S₂O₅²⁻: metabisolfito

Madero & Finne (1982) riscontrarono che il bisolfito esercita un effetto inibitorio di tipo competitivo sulla PPO, creando legami con i gruppi sulfidrilici del sito attivo dell'enzima. Per Ferrer *et al.*, (1989) invece l'azione del bisolfito sarebbe dovuta alla reazione dei solfiti con i chinoni, con conseguente formazione di sulfo-chinoni in grado di inibire irreversibilmente l'enzima.

I solfiti vengono anche utilizzati nella stabilizzazione del “*flavour*” e del colore del vino. La concentrazione di SO₂ totale è soggetta a limiti di legge ben precisi, in Italia per i vini rossi il limite è fissato a 160 mg/l e per i vini bianchi a 210 mg/l. La concentrazione di solfito necessaria per il controllo dell'imbrunimento enzimatico varia a seconda dell'alimento e del tempo richiesto per inibire la reazione (Taylor *et al.*, 1986). In presenza di substrati monofenolici, come la tirosina nelle patate, basse quantità di solfiti sono sufficienti per inibire l'imbrunimento; mentre nel caso dell'avocado, dove sono presenti substrati difenolici, sono richieste alte concentrazioni. L'L(+)-acido ascorbico è un agente riducente presente in natura, moderatamente forte, in grado di formare sali con le basi e solubile in acqua. L'L(+)-acido ascorbico (vitamina C) e i suoi sali possono essere utilizzati su frutta, verdura e succhi per la prevenzione dall'imbrunimento e da altre reazioni ossidative (Bauernfeind & Pinkert,

1970). L'L(+)-acido ascorbico agisce inoltre come agente sequestrante dell'ossigeno molecolare, indispensabile alla reazione. La sua azione inibitrice nei confronti della PPO è stata attribuita alla riduzione degli o-chinoni (Walker, 1977). Solitamente viene utilizzato in sinergia con l'acido citrico per mantenere un livello di pH acido. È stato dimostrato inoltre, il suo effetto chelante sullo ione Cu^{2+} presente nel sito attivo dell'enzima (Whitaker, 1972).

La cisteina è un'efficace inibitore, anche se le concentrazioni richieste per un'inibizione accettabile, hanno un effetto negativo sull'impatto organolettico.

L'inibizione della PPO avviene grazie alla formazione di complessi cisteina-chinoni (Richard-Forget *et al.*, 1992).

Agenti acidulanti

I gruppi ionizzabili nella struttura delle proteine enzimatiche possono essere influenzati dal pH del mezzo. Essi devono essere presenti in un'appropriata forma ionizzata, per poter mantenere la conformazione del sito attivo, il legame con i substrati o per catalizzare la reazione (Segel, 1976).

I cambiamenti nello stato di ionizzazione degli enzimi solitamente sono reversibili, tuttavia in condizioni di pH estremo si possono verificare denaturazioni irreversibili.

Gli acidulanti, impiegati singolarmente o in combinazione con altri agenti antimbrunimento vengono generalmente utilizzati per mantenere il pH al di sotto dell'optimum richiesto dall'enzima.

Acidulanti quali acido citrico, malico e fosforico sono capaci di abbassare il pH del sistema, inattivando così la PPO. (Richardson & Hyslop, 1985).

Nell'industria alimentare l'acido citrico è l'acidulante più utilizzato in combinazione con l'acido ascorbico per l'inattivazione della PPO. Esso può svolgere l'azione inibitrice attraverso l'abbassamento del pH, o grazie alla chelazione dello ione Cu^{2+} .

Agenti chelanti

Alcuni enzimi contengono nel sito attivo uno ione metallico. La sua rimozione dovuta alla formazione di complessi con agenti chelanti, può rendere l'enzima inattivo. I chelanti utilizzati nell'industria alimentare sono l'acido sorbico, acidi policarbossilici

(citrico, malico, tartarico, ossalico e succinico), polifosfati (ATP e pirofosfati), macromolecole (proteine) e EDTA.

L'EDTA e il calcio disodio EDTA hanno avuto l'approvazione dalla "Food and Drug Administration" per essere utilizzati come additivi negli alimenti (Figura 8).

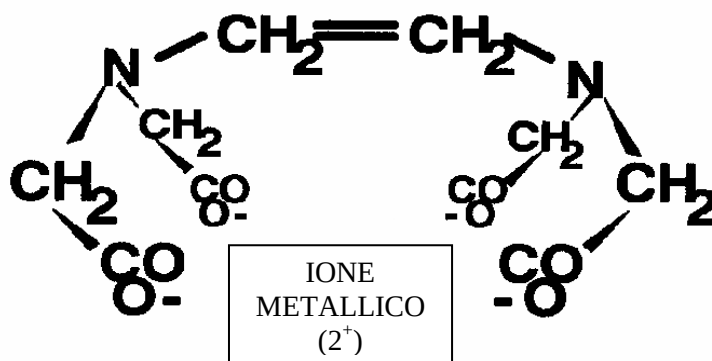


Figura 8. Complesso EDTA
ione metallico.

La massima attività si ha ad alti valori di pH in cui i gruppi carbossilici si trovano in uno stato dissociato (Dziezak, 1986).

I polifosfati, il sodio pirofosfato acido e i metafosfati vengono utilizzati come agenti antimbrunimento a concentrazioni tra 0.5 ÷ 2 % (McEvily *et al.*, 1992).

L'acido kojico, è un metabolita fungino prodotto da *Aspergillus* e *Penicilium*. È un ottimo chelante di ioni metallici quali Fe^{3+} , e Cu^{2+} (Beèlik, 1956). È presente in molti alimenti orientali fermentati e possiede attività antibatterica e antifungina. Acido ascorbico e kojico utilizzati sinergicamente fungono da agenti antimbrunimento.

Il monossido di carbonio è un inibitore di molte ossidasi contenenti Cu; non competitivo dei substrati fenolici, in grado di inibire l'attività della PPO.

Inibitori enzimatici

Gli alogenuri di sodio esercitano azione inibitoria nei confronti della PPO (Vàmos-Vigyàzò, 1981). Janovitz-Klapp *et al.*, (1990) dimostrarono che NaF è un potente inibitore della PPO della mela, come NaCl, NaBr e NaI. Il grado d'inibizione decresce all'aumentare del pH.

Kidron *et al.*, (1978) riportano l'azione inibitoria dell'etanolo sulla PPO. L'azione degli alcoli alifatici aumenta con l'aumento della lunghezza della catena.

Enzimi “killer”

È stata dimostrata l'attività degli enzimi “killer” in grado d'inattivare alcune PPO attraverso diversi meccanismi.

L'o-metil transferasi è in grado di metilare la posizione 3 dei composti 3,4-diidrossi aromatici portando alla modificazione irreversibile dei substrati fenolici (Finkle & Nelson, 1963).

Possono venire utilizzate anche alcune proteasi di origine vegetale come ficina e papaina (Labuza *et al.*, 1992).

Agenti complessanti

Le ciclodestrine sono un gruppo di oligosaccaridi ciclici derivanti dall'amido con sei, sette o otto residui di glucosio legati tramite legami glicosidici α (1 $\rightarrow$ 4) in una struttura cilindrica, nota come α , β , γ – ciclodestrine (Nùñez-Delicado *et al.*, 2005) La cavità centrale è idrofobica mentre la regione esterna è idrofilica.

La cavità idrofobica può formare complessi d'inclusione con diverse molecole, compresi i fenoli, prevenendo così l'ossidazione a chinoni e la loro susseguente polimerizzazione con formazione di pigmenti bruni (Cai *et al.*, 1990).

Il chitosano è un polimero della β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-D-glucosammina, ottenuti dalla chitina dei crostacei. Presenta proprietà antimicrobiche, è solubile in acidi organici diluiti. L'effetto inibitorio è dovuto probabilmente alle cariche positive del polimero, in grado di adsorbire le molecole di PPO presenti nel substrato o prodotto.

1.14 La tecnica MALDI-MS

L'utilizzo di tecniche analitiche basate sulla spettrometria di massa che permettano la determinazione del peso molecolare di proteine e loro successiva identificazione tramite analisi dei peptidi derivanti dalla loro digestione enzimatica potrebbe essere sicuramente di grande utilità.

Attualmente sono due le tecniche spettrometriche di massa che permettono l'analisi e la caratterizzazione di proteine, anche ad alto peso molecolare: la ionizzazione electrospray (ESI) (Whitehouse *et al.*, 1985) e la ionizzazione/desorbimento laser assistita da matrice (MALDI) (Haleem, 2001).

La tecnica di ionizzazione ESI è generalmente applicata nell'analisi di miscele proteiche e nell'analisi di digeriti enzimatici di proteine accoppiandola direttamente con la cromatografia liquida (LC).

La tecnica MALDI-MS consente l'analisi di miscele proteiche complesse senza separazione cromatografica dei diversi componenti.

La tecnica MALDI si basa sul processo di desorbimento/ionizzazione tramite irraggiamento laser di una soluzione solida formata dall'analita e da un opportuna matrice. Vengono utilizzate come matrici molecole organiche con basso peso molecolare che possiedono una banda di assorbimento alla stessa lunghezza d'onda del laser utilizzato.

Generalmente esse contengono gruppi funzionali acidi in grado di cedere un protone e quelle più comunemente usate sono acidi benzoici variamente sostituiti, derivati dell'acido cinnamico.

Le principali funzioni della matrice sono:

- Fungere da solvente per le molecole da analizzare: le molecole di analita vengono separate le une dalle altre dalla matrice, favorendo la formazione di co-cristalli matrice/analita, essenziale per l'ottenimento di uno spettro di massa MALDI. Il rapporto molare matrice/campione varia a seconda del tipo di analita: in generale per le proteine è di circa 10000/1, mentre è di circa 200/1 per polimeri sintetici;
- Assorbire l'energia dall'impulso laser e trasformarla in energia di eccitazione vibrazionale del sistema solido, inducendo un istantaneo cambiamento di fase di un microvolume di analita. Questo avviene solo dopo aver raggiunto una soglia energetica, il che indica che il processo è collettivo e non si tratta di semplice evaporazione molecolare. Si forma così un gas ad alta densità che si espande nel vuoto a velocità supersonica;
- Avere un ruolo attivo nel processo di ionizzazione delle molecole di analita. Anche se non è ancora ben chiaro il reale meccanismo di desorbimento/ionizzazione nella tecnica MALDI, sicuramente la radiazione laser provoca fotoionizzazione di molecole di matrice che a loro volta inducono ionizzazione chimica nelle molecole di analita [M]. Si formano così molecole protonate $[M+H]^+$, ioni molecolari multicarica $[M+nH]^{n+}$, ioni addotti tra molecole di analita $[nM+H]^+$, ioni addotti tra molecole di analita e matrice $[M+matrice]^+$, ioni cationizzati $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$. Gli ioni più abbondanti sono

in ogni caso quelli dovuti a molecole protonate, cioè $[M+H]^+$. A causa della diversa velocità di cristallizzazione della matrice e dell'analita, in genere si ha formazione di un campione solido disomogeneo. Le caratteristiche chimico-fisiche delle varie matrici fanno sì che la matrice da usare sia diversa a seconda del tipo di analita, del suo peso molecolare e del solvente in cui esso è solubile.

Il meccanismo di ionizzazione operante nella tecnica MALDI non è ancora del tutto noto a causa della complessità dei fenomeni fisici e chimici che portano alla formazione di specie ioniche dell'analita.

Si ipotizza che in seguito all'interazione del raggio laser con la superficie del co-cristallo matrice-analita si abbia la formazione di uno strato di gas ad alta densità in cui molecole di matrice ionizzate interagiscano con molecole neutre di analita, portando alla formazione di molecole protonate $[M + H^+]$ dell'analita stesso (Figura 9).

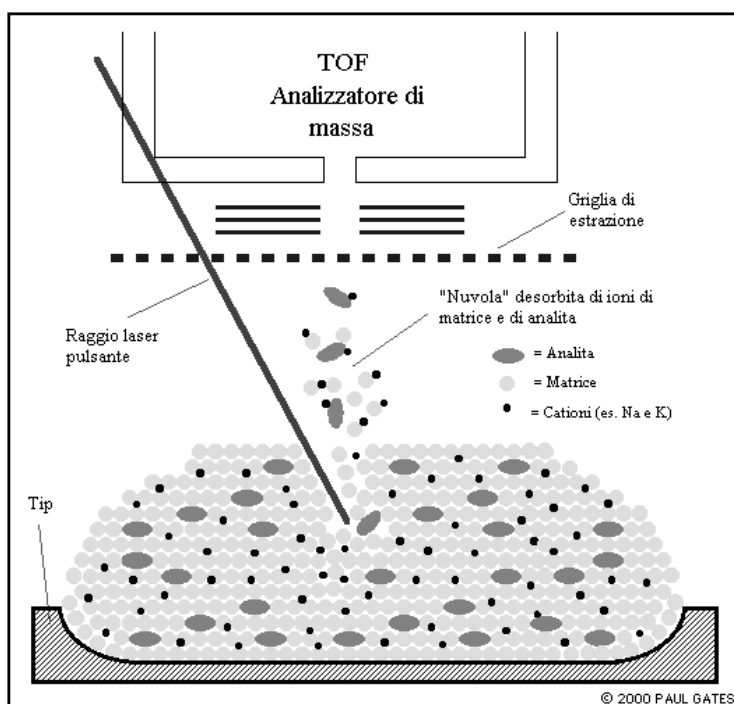


Figura 9. Meccanismo di ionizzazione MALDI-MS.

Il desorbimento di specie reattive dal cristallo e la formazione di $[M+H]^+$ è strettamente collegato all'intensità del raggio laser. Un minimo aumento dell'intensità rispetto al valore della soglia di desorbimento porta ad un notevole aumento del numero di ioni

molecolari prodotti. Al contrario un forte aumento dell'intensità del fascio laser porta a consistente fotoframmentazione dell'analita.

Nel processo di desorbimento/ionizzazione laser gli ioni vengono generati in tempi dell'ordine di 10^{-7} s ed è quindi necessario l'uso di un analizzatore che separi gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) in tempi particolarmente ristretti ed a tale scopo vengono utilizzati analizzatori a tempo-di-volo (TOF, "*Time-of-Flight*"), come schematizzato in Figura 10.

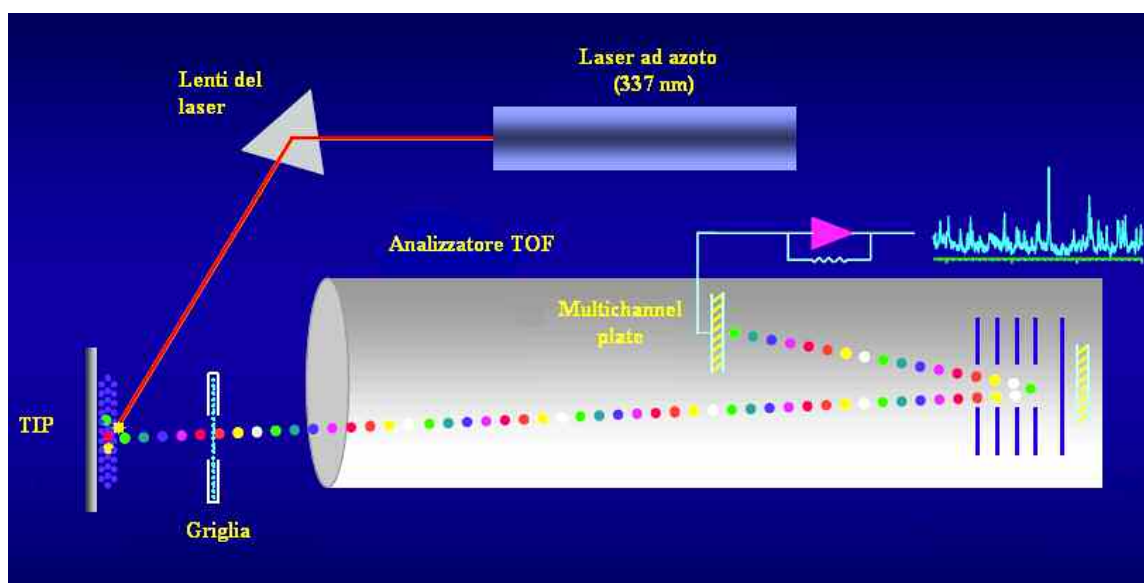


Figura 10. Schema di uno spettrometro di massa MALDI-TOF.

Il sistema laser è costituito, generalmente, da un laser ad N_2 ($\lambda=337$ nm) con energia di 100 μ J e tempo di emissione di 100 ns.

Il sistema ottico presenta una serie di specchi che permettono di convergere una parte del fascio (1%) verso un rilevatore, che dà il segnale per iniziare l'acquisizione dello spettro di massa. Il restante 99% può essere controllato, attraverso software, mediante un opportuno attenuatore per ridurre l'energia del fascio fino al 40% e quindi ottimizzare la quantità di ioni formati.

Per permettere la volatilizzazione dell'analita in seguito ad interazione con il raggio laser dovrà essere $T_{\text{surf}} \geq T_{\text{subl}}$ dove:

T_{surf} = temperatura di riscaldamento della superficie in seguito a contatto con la radiazione;

T_{subl} = temperatura di fusione o sublimazione della matrice.

Nello strumento utilizzato in questa ricerca, la sorgente ionica è costituita da una piastra (IS1, Figura 11) su cui viene inserito il portacampioni in acciaio inox, a cui viene applicato un potenziale variabile da -20 kV (rivelazione di ioni negativi) a $+25\text{ kV}$ (rivelazione di ioni positivi).

Una seconda piastra è posta tra quella di accelerazione e quella posta a terra (IS2, Figura 11), a cui viene applicato un potenziale uguale a quello di accelerazione per un certo periodo di tempo (delay time, ns); dopodichè viene abbassato di una certa percentuale rispetto al potenziale di accelerazione. In questo modo gli ioni vengono “intrappolati” in prossimità della superficie del portacampione, limitando la dispersione di energia cinetica dovuta alla disomogeneità del potenziale nei diversi punti del portacampioni e

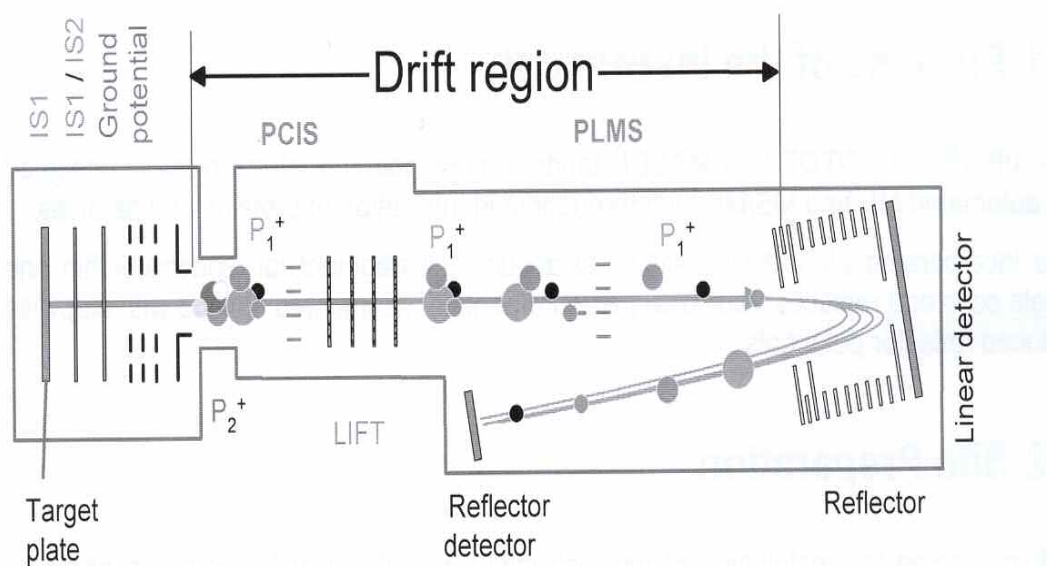


Figura 11. Schema della sorgente ionica dello strumento utilizzato (Ultraflex II, Bruker Daltonics).

sulla superficie del co-cristallo matrice-campione. I valori di IS1, IS2 e delay time devono essere variati a seconda del peso molecolare dell’analita in modo da aumentare la risoluzione di massa e il rapporto segnale/rumore.

Con l’analizzatore TOF si può operare due modalità: *linear*, in cui sorgente ionica e detector sono separati da uno spazio libero sotto vuoto e *reflectron*, in cui viene utilizzato uno diottro ionico (*reflectron*), costituito da una serie di elettrodi posti a

potenziali crescenti fino ad arrivare all'ultimo elettrodo a cui è applicato un potenziale leggermente più elevato rispetto a quello di accelerazione (Figura 12).

In modalità *linear* ioni con massa diversa sottoposti ad un campo elettrico V acquistano velocità differenti e raggiungono quindi il detector in tempi diversi.

Per il principio di conservazione dell'energia, l'energia potenziale degli ioni ($z \cdot V$) si trasforma in energia cinetica, E_{CIN} ($1/2 m \cdot v^2$):

$$z \cdot V = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \rightarrow v = \sqrt{2 \frac{z \cdot V}{m}}$$

Dato che $v = s/t$ e che il potenziale applicato a tutte le particelle è teoricamente uguale, se due ioni di massa diversa percorrono lo stesso spazio con velocità diverse dovute al differente rapporto massa/carica, arriveranno al rilevatore con tempi diversi, in particolare lo ione più piccolo arriverà prima di quello di massa superiore.

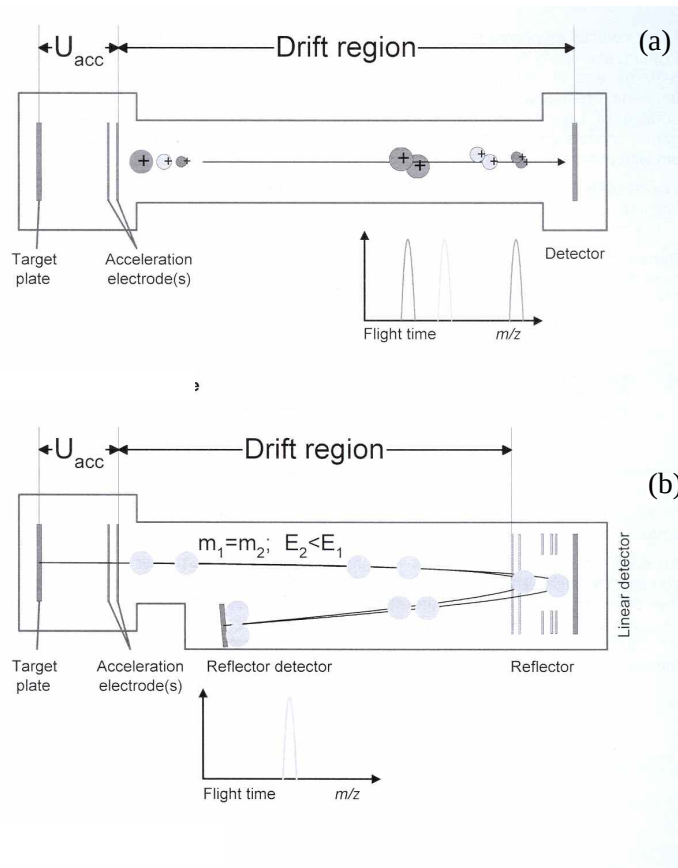


Figura 12. Analizzatore TOF: (a) linear e (b) reflectron.

Considerando che la dispersione di E_{CIN} dovuta alla non perfetta uniformità del campo di accelerazione V è sempre presente, si utilizza il *reflectron*, che permette di annullare

eventuali eccessi o difetti di E_{CIN} di ioni con lo stesso m/z con il conseguente ottenimento di una più elevata risoluzione. Ioni con più elevata E_{CIN} penetrano più profondamente all'interno del reflectron di ioni con lo stesso m/z , ma E_{CIN} inferiore. In uscita dal reflectron vengono focalizzati sul rivelatore.

Il rivelatore è un *multichannel plate* (Figura 13), che permette l'analisi di ioni separati dall'analizzatore con tempi di risposta (10^{-9} s) compatibili con la velocità con cui sono prodotti. Questo dispositivo è una piastrina circolare con un'alta densità di moltiplicatori di elettroni capillari in silice fusa (diametro interno di 10-100 μm) tra loro paralleli in cui gli ioni impattano generando una cascata di elettroni che vengono convertiti in segnale digitale.

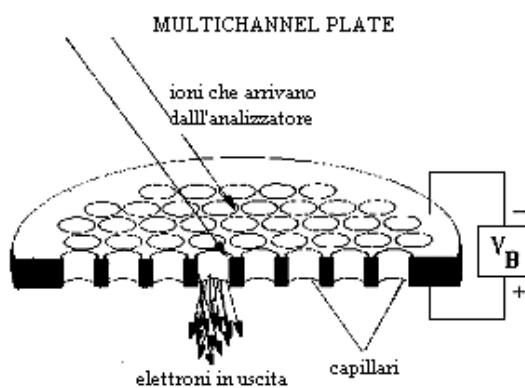


Figura 13. Microchannel plate.

2. SCOPO DELLA TESI

Il primo obiettivo è stato quello di monitorare la presenza e l'attività di pectin metilesterasi, β -glucosidasi ed esterasi mediante saggi spettrofotometrici ed elettroforetici su uve e vinacce Moscato bianco e Prosecco, raccolte durante la vendemmia 2004 ed insilate (Figura 14). In un caso è stata condotta una fermentazione spontanea, nell'altro è stato inoculato un ceppo commerciale di lievito. La presenza delle attività enzimatiche è stata quindi correlata alla variazione della composizione chimica della vinaccia e della *Grappa* ottenuta al termine del periodo di insilamento.

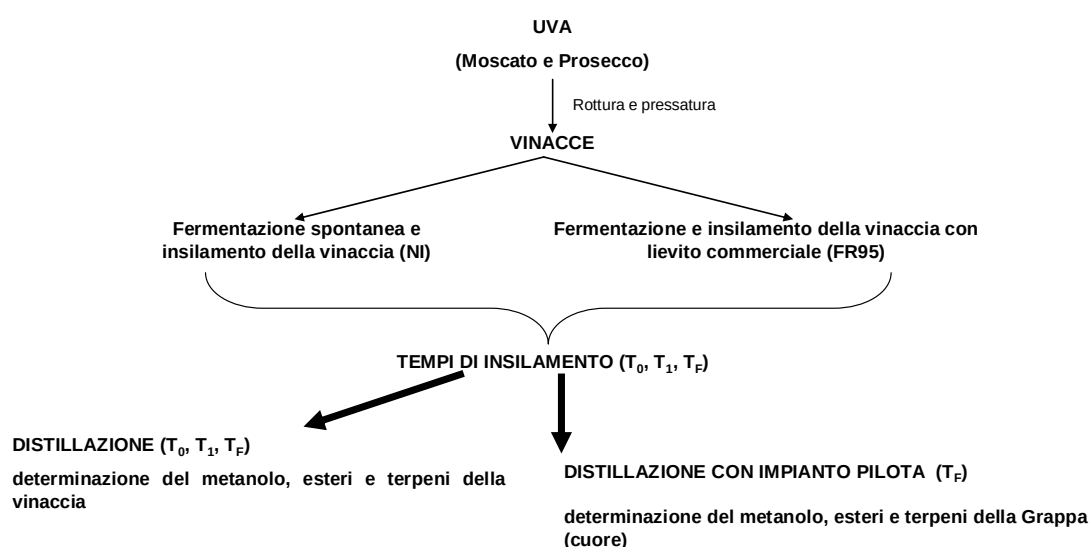


Figura 14. Schema della preparazione, conservazione e distillazione delle vinacce di Moscato e Prosecco.

Il secondo obiettivo ha avuto come oggetto l'individuazione di mezzi capaci di ridurre efficacemente la produzione di metanolo in mosti di uva e vinacce e i loro prodotti fermentati e distillati. A questo scopo è stato utilizzato un inibitore della PME purificato dal kiwi e del suo omologo ottenuto per via ricombinante, testandoli in mosti di uva e vinacce a tempi diversi di incubazione.

Il terzo obiettivo ha riguardato l'analisi quantitativa e la caratterizzazione qualitativa di un altro enzima di interesse tecnologico: la polifenolossidasi.

Il primo aspetto ha preso in considerazione la messa a punto di un sistema di estrazione e parziale purificazione specifico per l'attività PPO. Tramite analisi spettrofotometriche

è stata calcolata l'attività specifica e determinati l'optimum di alcuni parametri chimico fisici, importanti dal punto di vista cinetico. Utilizzando diversi approcci elettroforetici è stato possibile evidenziare differenze zimografiche date dalla diversa solubilità dell'enzima in condizioni native e in presenza di detergenti. Con la tecnica 2-DE è stato ottenuto un profilo zimografico più dettagliato, grazie alla maggiore capacità di separazione e purificazione raggiunta, che ha permesso di intraprendere un'analisi proteomica di base delle isoforme enzimatiche individuate.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Uva e vinaccia

Per gli esperimenti di laboratorio sono state utilizzate uva e vinaccia di Moscato (*Vitis vinifera* cv. Moscato bianco) e Prosecco (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) raccolte a mano durante la vendemmia 2004. Il Moscato era proveniente dall'azienda Salmaso (Battaglia Terme, PD) mentre il Prosecco dalla Scuola Enologica di Conegliano Veneto (Treviso). L'uva si presentava perfettamente integra e non danneggiata, è stata lavata con acqua distillata per eliminare la componente microbica spontanea associata alla pruina della buccia e conservata a - 80°C per essere poi sottoposta alla successiva estrazione e analisi chimiche. Dopo le fasi di diraspa-pigiatura e torchiatura la buccia dell'uva (T_0), utilizzata per le diverse prove, è stata insilata in condizioni essenzialmente anaerobiche in sacchi di plastica da 50 kg. La fermentazione è avvenuta a una temperatura ambiente compresa tra i 20° e i 30°C. Le vinacce fermentate sono state prelevate dai sacchi di insilamento dopo 3 g (T_1) e dopo 10 g (T_F) dalla torchiatura.

3.2 Inoculo della vinaccia

Per l'inoculo della vinaccia è stato utilizzato 1 ceppo di lievito commerciale, il *S. cerevisiae* "Blastosel FR 95" (Perdomini, Verona, Italia). Prima dell'inoculo, il lievito è stato risospeso in H₂O distillata sterile a 35°C per 20 min e seminato in terreno di coltura YPG (Prolabo, Francia). L'inoculo aveva una concentrazione di 10⁶ CFU/g di vinaccia (ALLEGATI - Figura 1 a, b).

3.3 Estrazione della proteina

La procedura di estrazione utilizzata è quella proposta da Zocca *et al.* (2007). 40 g di uva, privata dei vinaccioli, sono stati polverizzati in un mortaio con azoto liquido e omogeneizzati per 3 h in un bagno di ghiaccio con 80 ml di tampone 0.5 M Tris-HCl pH 8.5 contenente: 1% Triton X-100 (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) (p/v), 20% glicerolo (v/v), 5% PVPP (Sigma, St. Louis, MO, USA) (p/v), 2 M NaCl e 14 µl di β-mercaptoetanol, quest'ultimo utilizzato solo nell'estrazione delle proteine da vinaccia. La sospensione è stata centrifugata a 4°C e 20000 g per 30 min ottenendo così il primo

supernatante (SPT1). L'intera procedura di estrazione è stata ripetuta sul pellet ottenendo un secondo supernatante (SPT2). SPT1 e SPT2 sono stati quindi riuniti, filtrati prima con carta da filtro (Whatman n° 1) e successivamente con filtri in nitrocellulosa (Millipore 0.22 µm, USA). La soluzione è stata in seguito dializzata a 4°C con membrane di 8000 Da di *cut-off* (Spectrum membrane, USA) per 24 h cambiando ripetutamente il solvente costituito da H₂O distillata. I campioni ottenuti sono stati liofilizzati (Edwards Mini Fast 1700) a - 40°C e conservati in freezer a - 20°C.

3.4 Determinazione della proteina

Il contenuto in proteina dei campioni è stato determinato secondo la metodica proposta da Bradford (1976). In cuvette da 2 ml sono stati miscelati 1 ml di Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, USA), 0.95 ml di H₂O Milli-Q e 50 µl di estratto di proteina, ottenuto mediante diluizione di 10 mg di liofilizzato in 1 ml di tampone TBS. Il campione solubilizzato prima delle determinazioni spettrofotometriche ed elettroforetiche, è stato centrifugato per 30 min a 20000 g e 4°C. Nella prova in bianco è stata utilizzata la stessa miscela di reattivi in assenza dell'estratto. I valori di assorbanza, determinati a 595 nm, utilizzando come riferimento albumina di siero bovina (BSA, BIO-RAD, Milano, Italia). Tutte le prove sono state eseguite in triplo.

3.5 Determinazione spettrofotometrica attività pectin metilesterasica

L'attività PME è stata determinata spettrofotometricamente seguendo il metodo proposto da Hagerman & Austin (1986) ed apportando alcune modifiche, come segue. Il substrato della reazione enzimatica era costituito da 2 ml di soluzione di pectina di mela allo 0.5% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA) miscelata con 0.8 ml di H₂O Milli-Q e 0.15 ml di blu di bromotimolo allo 0.04% (p/v) in tampone fosfato pH 7.5 (0.01 M Na₂HPO₄/NaH₂HPO₄, 0.15 M NaCl PBS). Tutte le soluzioni sono state aggiustate a pH 7.5 con NaOH. La cinetica dell'attività enzimatica è stata monitorata a 25°C e 620 nm con uno spettrofotometro JASCO 7800 UV/Vis per 40 min, dopo aver aggiunto al substrato 50 µl di estratto vegetale, ottenuto mediante diluizione di 10 mg di liofilizzato in 1 ml di tampone PBS pH 7.5. Il bianco era costituito dal medesimo estratto in assenza del substrato. L'attività PME è definita come la diminuzione di unità di assorbanza per

minuto per grammo di vinaccia ($\Delta A_{620}/\text{min/g}$ vinaccia). Ogni determinazione è stata effettuata in triplo.

3.6 Determinazione attività esterasica

L'attività esterasica è stata determinata spettrofotometricamente secondo il metodo descritto da Lomolino *et al.* (2003). 50 μl di substrato, preparato miscelando 1 ml di Triton X-100 al 10 % (p/v) e 20 mg di *p*-nitrofenil acetato (Sigma, St Louis, MO, USA), sono stati posti in cuvetta insieme a 1.9 ml di tampone PBS 10 mM, pH 7.5 e 50 μl di estratto vegetale ottenuto come sopra. Quest'ultimo era assente nella prova in bianco costituita dal substrato portato a volume con tampone PBS. La cinetica dell'attività enzimatica è stata monitorata a 37°C e 400 nm con uno spettrofotometro JASCO 7800 UV/Vis per 60 min. L'attività esterasica è stata definita come l'aumento di unità di assorbanza per minuto per grammo di vinaccia ($\Delta A_{400}/\text{min/g}$ vinaccia). Ogni determinazione è stata effettuata in triplo.

3.7 Determinazione attività β -glucosidasica

L'attività è stata misurata spettrofotometricamente usando come substrato il *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranoside (Sigma, Milano, Italia). A 50 μl di soluzione campione sono stati aggiunti 250 μl di tampone Na-acetato 0.1 M, pH 5.1 e 300 μl di substrato (1 mM in tampone Na-acetato 0.1 M, pH 5.1). Il tutto è stato incubato a 37°C per 30 min. La reazione veniva poi bloccata con l'aggiunta di 400 μl di Na_2CO_3 1 M e l'assorbanza letta a 400 nm con uno spettrofotometro JASCO 7800 UV/Vis a 25°C. L'attività β -glucosidasica è stata definita come l'aumento di unità di assorbanza per minuto per grammo di vinaccia ($\Delta A_{400}/\text{min/g}$ vinaccia). Ogni determinazione è stata effettuata in triplo.

3.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PME, ESTs e β G)

Le prove elettroforetiche sono state condotte utilizzando l'apparato Mini Protean II (BIO-RAD, Milano, Italia) con un gel di poliacrilamide al 16%, 10% per la PME (dimensioni del gel 8 $\times$ 6 $\times$ 0.1 cm) ad un voltaggio costante di 70 V. Il tampone di

corsa elettroforetica era costituito da Tris 25 mM, glicina 192 mM con SDS. 10 mg di liofilizzato sono stati solubilizzati con 700 μ l di H₂O Milli-Q e 300 μ l di tampone 1.33 M Tris (pH 7.4) contenente glicerolo 40% (v/v) e SDS 8% (p/v). La quantità di proteina caricata era di 50 μ g.

3.9 Zimogramma dell'attività pectin metilesterasica

Durante la preparazione di un gel di poliacrilamide al 10% è stata aggiunta una soluzione di pectina di mela 0.04% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Gli estratti proteici analizzati sono stati addizionati di 30 μ l di glicerolo al 70% (p/v). Dopo l'elettroforesi i gels sono stati abbondantemente lavati per 10 min in tampone PBS pH 7.5, l'operazione è stata ripetuta tre volte. L'attività PME è stata rilevata utilizzando una soluzione di rosso rutenio come descritto da Kawano *et al.* (1999).

3.10 Zimogrammi dell'attività esterasica

Terminata la corsa elettroforetica, il gel veniva lavato abbondantemente per 10 min in tampone PBS 10 mM, pH 7.5, questa operazione era ripetuta tre volte. Successivamente il gel veniva immerso in tampone PBS 10 mM, pH 7.5 in presenza di fluoresceina diacetato (Sigma, St. Louis, MO, USA), β -naftil acetato (β -NA, Fluka, Buchs, Svizzera) o β -naftil butirato (β -NB, Fluka, Buchs, Svizzera) e Fast BB (Fluka, Buchs, Svizzera). I substrati sono stati preparati sciogliendo rispettivamente 20 mg di 2 β -NA e 2 β -NB in 1 ml di Triton X-100 10% (p/v) e il tutto viene sciolto in 100 ml di PBS 10 mM, pH 7.5. La fluoresceina diacetato invece è stata sciolta direttamente in PBS. Dopo circa 45 min di agitazione e incubazione a 37°C, comparivano sullo zimogramma delle bande rosso scuro relative all'attività esterasica (Rizzi *et al.*, 2003).

3.11 Zimogrammi dell'attività β -glucosidasica

Dopo la corsa elettroforetica i gel sono stati posti a contatto per 10 min, a temperatura ambiente, con tampone Na-acetato 0.1 M, pH 5.1 per stabilizzare il pH ai valori ottimali dell'enzima. I gel così trattati sono stati poi posti a contatto con il substrato di reazione, ottenuto sciogliendo in 100 ml di tampone Na-acetato, 0.01% (p/v) di fluoresceina di- β -D-glucopiranoside (Invitrogen, Milano, Italia). I gel sono stati poi incubati per 20 min a

25°C, in agitazione costante. Le immagini sono state poi acquisite con l'apparato Gel Doc 1000 (BIO-RAD, Hercules, USA).

3.12 Distillazione della vinaccia (T_0 , T_1 , T_F)

100 g di vinaccia sono stati distillati con l'aggiunta di 300 ml di H₂O deionizzata con un distillatore Cazenave. Sono stati raccolti 100 ml di distillato e analizzati per la determinazione del metanolo, esteri e terpeni della vinaccia (De Rosa & Castagner, 1994).

3.13 Distillazione con impianto pilota (T_F)

5 kg di ciascun campione di vinaccia insilata, provenienti dai sacchi da 50 kg, sono stati distillati tramite un sistema tradizionale ad alambicco in rame con l'aggiunta di 1 l di H₂O deionizzata. Come fonte di calore si è impiegato un fornello a gas. Prima del riscaldamento l'alambicco è stato chiuso ermeticamente per evitare la fuoriuscita del vapore. Quando la temperatura raggiungeva gli 80-90°C, il distillato cominciava a uscire dall'alambicco e il liquido era raccolto in tre frazioni denominate: la testa (V = 150 ml) la prima a uscire, il cuore (V = 600 ml) e la coda (V = 150 ml). Il distillato è stato conservato in bottiglie di vetro scuro, chiuse ermeticamente a 4°C fino al momento dell'analisi.

3.14 Analisi gascromatografica (alcol, esteri e terpeni)

Per l'analisi degli alcol e degli esteri è stato utilizzato un gascromatografo Carlo Erba GC 6000 Vega Series (Milano, Italia) dotato di rivelatore FID e iniettore manuale. La colonna impiegata era una Carbopack C 80-100, C 1500, 0.2%, 2 m (Sigma, St Louis, MO, USA). La temperatura dell'iniettore e del rivelatore era di 170°C. La temperatura iniziale della colonna era di 40°C per i primi 6 min, e successivamente aumentava linearmente da 40°C a 145°C con un incremento di 5°C/min, seguiva un'isoterma di 10 min a 145°C. In seguito la temperatura cresceva dai 145 ai 170°C con un aumento di 10°C/min e veniva bloccata a 170°C per 5 min. Un'aliquota di 5 ml di ciascuna frazione di distillato era miscelata con del 3-pentanololo, utilizzato come standard interno. La quantificazione è stata espressa come mg per 100 ml di alcol anidro (a.a.).

Per l'analisi dei terpeni è stato impiegato un GC 8000 TOP CE dotato di campionatore automatico AS 2000 Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La colonna era una CP-Wax 52 CB, 30 m (Chromtech, Apple Valley, MN, USA). La temperatura dell'iniettore e del rivelatore era di 250°C. La rampa della temperatura era la seguente: 3 min di isoterma a 165°C, da 165 a 185°C con un incremento di 4°C/min. Un'aliquota (5 ml) di distillato era miscelata con differenti quantità di standard interno, in questo caso l'n-dodecanolo.

3.15 Analisi sensoriale

La *Grappa* è stata valutata sensorialmente alla fine della distillazione. I campioni sono stati diluiti fino ad ottenere una gradazione alcolica del 37.5% e refrigerati a 14°C in bicchieri di vetro coperti fino al momento dell'analisi. Il panel di assaggiatori comprendeva 15 persone che avevano seguito un breve corso per assaggiatori di distillati e che erano in grado di identificare dei campioni standard di aromi. La valutazione sensoriale è stata effettuata in apposite cabine di assaggio individuali (ISO 8589:1988). Le condizioni fisiche della stanza di assaggio, quali la temperatura e l'umidità erano mantenute sotto controllo e per ogni prova venivano somministrati all'assaggiatore tre campioni. Il test utilizzato era il “*triangle test*” (ISO 4120:2004). Questo metodo viene applicato quando la “natura” della differenza riscontrabile nel prodotto, è sconosciuta. I dati raccolti sono stati elaborati con un apposito programma (FIZZ-Biosystemes, Couternon, Francia).

3.16 Determinazione su piastra dell'attività pectin metilesterasica

L'attività PME è stata determinata utilizzando un test a gel diffusione su piastre Petri (Downie *et al.*, 1998). Della pectina di limone (Sigma, St. Louis, MO, USA) alla concentrazione dello 0.1% (p/v) esterificata al 94%, è stata addizionata ad un tampone McIlvaine (0.1 M acido citrico/0.2 M Na₂HPO₄) a pH 7.0. che conteneva anche dell'agarosio al 2% (p/v) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). La solubilizzazione della pectina e dell'agarosio è avvenuta tramite riscaldamento in forno a microonde. Il tampone è stato leggermente raffreddato, addizionato di NaN₃ allo 0.05% (p/v) e la soluzione trasferita in piastre Petri (90 × 10 mm) nella quantità di 10 ml/piastra e lasciata solidificare. Sul gel si sono ricavati, tramite apposito strumento, dei

pozzetti del Ø di 3 mm in modo che la loro capienza in volume fosse di 10 µl. Le piastre Petri, una volta caricati i pozzetti dell'estratto enzimatico, venivano chiuse ermeticamente con del nastro parafilm e incubate a 30°C per 21 h in termostato. Dopo l'incubazione il gel era risciacquato con H₂O distillata e colorato con una soluzione acquosa di rosso rutenio (Sigma, St. Louis, MO, USA) allo 0.05% (p/v) per un tempo di 45 min. Il colorante veniva poi eliminato e il gel abbondantemente lavato con H₂O distillata. La zona più intensamente colorata di rosso, corrispondente all'azione enzimatica, veniva misurata tramite calibro sessagesimale. L'ammontare dell'attività in unità (U) è stata calcolata sulla base di una curva standard ottenuta dalla trasformazione logaritmica dell'attività dell'enzima commerciale, PME di buccia d'arancia (Sigma, St. Louis, MO, USA) contro il Ø della zona colorata.

3.17 Effetto degli inibitori sull'attività pectin metilesterasica

Con il metodo dell'attività su piastra Petri è stato evidenziato anche il possibile effetto di alcuni inibitori nei confronti dell'estratto enzimatico. È stata testata l'azione sull'attività dell'Na₂EDTA (0.1 M), CaCl₂ (0.1 M), (NH₄)SO₄ (0.1 M), (NH₄)Cl (0.1 M), saccarosio (0.1 M), D-(+)-acido galatturonico (0.1 M) e del PMEI (0.6 mg/ml estratto di kiwi, Giovane *et al.*, 1995). L'attività degli inibitori, nel bloccare l'azione della PME, è stata misurata a pH 7.0 seguendo sempre il metodo proposto da Downie *et al.*, (1998). Varie aliquote di inibitore sono state aggiunte a differenti quantità di estratto enzimatico e i relativi Ø, dati dall'attività, misurati.

3.18 Purificazione dell'inibitore PMEI da *Actinidia chinensis*

L'inibitore PMEI da *A. chinensis* è stato purificato e gentilmente fornito dalla Dott.ssa Laura Camardella (Istituto di Biochimica delle proteine ed Enzimologia, CNR, Napoli) secondo la procedura proposta da Bellincampi *et al.*, del 2003 e qui descritta in dettaglio. Frutti di kiwi maturi sono stati omogeneizzati in acqua nel rapporto 1:1 (p/v) e centrifugati a 15000 g per 20 min a 4°C. Il surnatante è stato portato a pH 7.5 con NaOH e direttamente precipitato con (NH₄)₂SO₄ al 70% di saturazione. Il precipitato è stato risospeso in Tris/HCl pH 7.5, 10 mM, NaCl 50 mM e dializzato la notte contro lo stesso tampone. Il dializzato è stato caricato su colonna Q-Sefarosio equilibrata in Tris/HCl pH 7.5, 10 mM e NaCl 100 mM. Dopo lavaggio la colonna era eluita in

gradiente lineare da 100 a 400 mM NaCl. Le frazioni contenenti attività inibitoria sono state raccolte, concentrate per ultrafiltrazione e caricate su colonna preparativa Superose 12 equilibrata in Tris/HCl pH7.5, 10 mM e NaCl 100 mM. L'inibitore così purificato è stato analizzato in SDS-PAGE al 12.5%.

3.19 Purificazione dell'inibitore PMEI espresso in *Pichia pastoris*

L'inibitore eterologo PMEI è stato espresso in *P. pastoris* dal Dott. Alessandro Raiola (Università di Padova), purificato e gentilmente fornito dalla Dott.ssa Laura Camardella secondo la procedura proposta da Bellincampi *et al.*, del 2003 e qui descritta in dettaglio. Il brodo di coltura di *P. pastoris* è stato filtrato e precipitato con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ all' 80% di saturazione. Il precipitato così ottenuto è stato raccolto per centrifugazione a 20000 g per 20 min, risospeso in un tampone Tris/HCl pH 8.5, 10 mM e dializzato esaustivamente contro lo stesso tampone. Dopo la dialisi, la soluzione è stata centrifugata a 20000 g per 20 min e caricata su una colonna MonoQ[®] (HR 10/10, Pfizer, New York, NY, USA) equilibrata con lo stesso tampone. Il PMEI è stato quindi eluito con un gradiente lineare da 0 a 0.5 M NaCl in 30 min ad un flusso di 1.5 ml/min. Le frazioni contenenti attività inibitoria sono state riunite, concentrate per ultrafiltrazione su filtri Centricon 3 (Millipore, Billerica, MA, USA) e caricate su una colonna di Sephadex[®] G75 (1.5 × 90 cm) equilibrata in Tris/HCl pH 7.5, 10 mM e NaCl 250 mM ad un flusso di 5 ml/h. Le frazioni contenenti attività inibitoria risultavano pure quando analizzate per SDS-PAGE al 12.5% e colorate con una soluzione di Coomassie[®] brilliant blue G250 (Pierce, Rockford, IL, USA). Il peso molecolare calcolato di 16 kDa corrispondeva a quello dedotto dalla sequenza di amminoacidi (16753 Da), e infatti nella proteina non erano presenti siti di glicosilazione. La proteina presentava un solo picco se analizzata per HPLC su colonna a fase inversa. La sequenza N-terminale (**EAEFENHLISEI**-PK) corrispondeva alla sequenza del gene clonato ed espresso, e mostrava la presenza di 4 amminoacidi aggiuntivi (in grassetto) corrispondenti al residuo del peptide segnale di *Pichia*.

3.20 Determinazione dell'inibizione della PME in mosto e vinaccia

La capacità dell'inibitore PMEI di bloccare l'attività PME e quindi la produzione di metanolo è stata verificata utilizzando i) del mosto non filtrato e ii) della vinaccia

incubata a differenti tempi di incubazione. Nel caso del mosto d'uva non filtrato, ad 1.0 ml di mosto sono stati aggiunti 0.1 ml di soluzione di NaN_3 (0.05% p/v) e 50 μl di soluzione PMEI (50 μg di PMEI). Nel bianco invece dell'inibitore sono stati impiegati 50 μl di H_2O Milli-Q. I campioni di mosto sono stati incubati a 30°C per 7 giorni. Per la vinaccia si sono impiegati 100 mg addizionati di 1.0 ml di NaN_3 (0.05% p/v) e 50 μl di soluzione PMEI (50 μg di PMEI). Nel bianco l' H_2O Milli-Q sostituiva l'inibitore. Il volume dei vials era di 4 ml. La vinaccia è stata incubata a 30°C per 14 e 28 giorni. La misura del metanolo prodotto è avvenuta come soluzione di pectina; dopo un tempo di equilibratura, di 2 min. La concentrazione di metanolo è stata quantificata usando la tecnica HS-SPME-GC seguendo parzialmente il metodo proposto da Huisman *et al.* (2004). Si è utilizzato un gascromatografo Thermo Finningan Trace GC Series (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dotato di rivelatore FID e un sistema di iniezione automatico. La fibra impiegata era una Supelco 65 μm Carbowax Divinilbenzene (Sigma, St Louis, MO, USA) e la colonna capillare una Chrompack PoraPLOT Q 27.5 m, 0.32 mm, 10 μm (Chromtech, Apple Valley, MN, USA). La temperatura iniziale della colonna era di 60°C mantenuta per 3 min e quella finale di 140°C con un incremento di 8°C/min. Come carrier è stato utilizzato l'elio con un flusso di 0.9 ml/min. La temperatura dell'iniettore era di 200°C e quella del rivelatore di 300°C. I vials sono stati equilibrati per 15 min a 50°C, la temperatura di adsorbimento era di 50°C per un tempo di 10 min, mentre la temperatura di desorbimento era di 200°C per un tempo di 2 min. Il metanolo prodotto dall'azione della PME è stato espresso in ppm.

3.21 Determinazione del grado di metilazione e del contenuto di acidi uronici

La determinazione del grado di metilazione nelle pareti cellulari di vite è stata effettuata dal Dott Vincenzo Lionetti (Università di Roma "La Sapienza"), secondo la procedura proposta da Lionetti *et al.*, 2007 e qui descritta in dettaglio. Le pareti cellulari (1 mg) estratte dalle bacche delle diverse varietà d'uva sono state saponificate sospendendole in NaOH 0.25 M. La soluzione è stata incubata a temperatura ambiente per 1 h e successivamente neutralizzata con HCl. Dopo aver centrifugato i campioni a 10000 g, un'aliquota del surnatante (20 μl) per ogni ripetizione (10 ripetizioni per cultivar) è stata inoculata in piastre con micropozzetti (Costar, Corning, NY, USA) e diluita con H_2O Milli-Q portandola ad un volume di 50 μl . Per ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 μl di

una soluzione contenente l'enzima alcol ossidasi (0.03 U; Sigma, St Louis, MO, USA), e incubando la miscela a temperatura ambiente per 15 min, in lenta agitazione. A questo punto sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione contenente 2-4 pentanedione 0.02 M in ammonio acetato 2 M e acido acetico 0.05 M e dopo 10 min di incubazione a 68°C, i campioni sono stati raffreddati in ghiaccio, leggendo l'assorbanza, con uno specifico spettrofotometro a 412 nm (ETI-System Reader, Sorin Biomedica Cardio S.p.A. Berlin, Germania). Il contenuto di metanolo è stato quantificato misurando la quantità di formaldeide prodotta enzimaticamente dall'alcol ossidasi usando come substrato il metanolo rilasciato in seguito alla saponificazione delle pareti cellulari (Klavons & Bennett, 1986). Una curva con diverse concentrazioni di metanolo è stata impiegata per la calibrazione del saggio. I pellet delle pareti cellulari precedentemente de-esterificate per saponificazione sono stati utilizzati per la determinazione del contenuto di acidi uronici. Dopo centrifugazione a 10000 g e eliminazione del surnatante, le pareti sono state trattate con 200 µl di una soluzione di acido trifluoracetico 2 M per 1 h a 121°C in tubi con tappo a vite. Al campione, si aggiungono 200 µl di isopropanolo e la fase liquida è fatta evaporare sotto flusso d'azoto. Il trattamento con isopropanolo è stato ripetuto due volte. Il contenuto di acidi uronici è stato quantificato sui campioni precedentemente trattati usando un saggio colorimetrico automatizzato, denominato “*sulphamate/m-hydroxy diphenyl assay*” (Filisetti-Cozzi & Carpita, 1991). La concentrazione di acidi uronici è stata ottenuta per confronto con una curva di calibrazione basata su diverse concentrazioni di acido D-(+)-acido galatturonico. Il grado di metilesterificazione è espresso come il rapporto molare (%) fra il metanolo rilasciato e il contenuto di acidi uronici.

3.22 Determinazione dell'attività polifenolossidasi

L'attività catecolasi e cresolasi sono state determinate spettrofotometricamente rispettivamente con i metodi proposti da Rapeanu *et al.* (2006) e Sharma *et al.* (2001). I substrati delle reazioni enzimatiche erano costituiti da 1.0 ml di catecolo 10 mM (Prolabo, Francia) per la catecolasi e 1.0 ml di *p*-cresolo 10 mM per la cresolasi, ambedue sciolti in tampone McIlvaine (0.1 M acido citrico/0.2 M Na₂HPO₄) a pH 5.0. Per ogni saggio sono stati utilizzati 80 µl di estratto vegetale, ottenuto diluendo 10 mg di estratto liofilizzato in 1.0 ml di tampone McIlvaine a pH 5.0. Il bianco era costituito solamente da 1.0 ml di substrato. La cinetica dell'attività enzimatica è stata monitorata

con uno spettrofotometro JASCO 7800 UV/Vis per 30 min e solo la parte lineare della curva (Δ assorbanza vs. tempo) è stata presa in considerazione per il calcolo delle attività enzimatiche specifiche. L'attività è stata espressa come il rapporto tra A/A_{max} (%), dove A_{max} era rappresentata dall'attività specifica massima ottenuta e A i singoli valori delle attività della serie. Per il calcolo è stata adottata l'unità arbitraria (AU/mg di proteina/min) corrispondente all'ammontare dell'enzima che determinava l'incremento di 0.001 unità di assorbanza per min^{-1} e mg^{-1} di proteina a 400 nm, pH 5.0 e 25°C, durante la fase lineare della reazione. Tutte le prove sono state eseguite in triplo utilizzando la medesima soluzione di estratto enzimatico.

3.23 Optimun di pH dell'attività polifenolossidasi

L'effetto del pH nell'attività catecolasi è stato determinato solubilizzando l'estratto liofilizzato in H₂O Milli-Q. Da questa soluzione sono state in seguito prelevate le aliquote di campione aggiunte al substrato, portato ai diversi pH. Si è utilizzato il tampone McIlvaine per i valori di pH compresi tra 3.0 e 7.5 e il tampone 0.2 M Na₂HPO₄/0.2 M NaH₂PO₄ per pH 8.0. Tutte le prove sono state eseguite in triplo, utilizzando la medesima soluzione di estratto enzimatico.

3.24 Stabilità termica dell'attività polifenolossidasi

È stata misurata a pH 5.0, a diverse temperature comprese tra 25 e 70°C, utilizzando un tempo di incubazione di 15 min. I campioni termicamente trattati sono stati poi raffreddati per 5 minuti in una soluzione di acqua e ghiaccio e l'attività residua A/A_{max} (%) misurata a 25°C. Tutte le prove sono state eseguite in triplo, utilizzando la medesima soluzione di estratto enzimatico.

3.25 Effetto degli inibitori sull'attività polifenolossidasi

L'effetto di inibizione del sodio metabisolfito (Riedel-De Haën, Germania), L(+)-acido ascorbico (Prolabo, Francia), acido citrico (Carlo Erba, Milano, Italia), L(+)-acido ascorbico e citrico, e sale disodico dell'acido EDTA (Prolabo, Francia) è stato testato per ogni inibitore a concentrazioni 5 e 15 mM. Ciascun inibitore è stato solubilizzato in tampone McIlvaine a pH 5.0. La miscela di reazione era costituita da 1.0 ml di catecolo

10 mM, 80 µl di estratto vegetale e 80 µl di inibitore. Tutte le prove sono state eseguite in triplo, utilizzando la medesima soluzione di estratto enzimatico.

3.26 Elettroforesi della PPO in Nativa-, SDS-, IEF-, e Deriphat-PAGE

Per la realizzazione della N-PAGE e SDS-PAGE è stato utilizzato l'apparato elettroforetico Mini Protean II (BIO-RAD, Milano, Italia) in condizioni di temperatura ambiente. Per le analisi zimografiche sono stati impiegati 10 µg di proteina. La separazione in SDS-PAGE è stata condotta seguendo la procedura descritta da Laemmli (1970), utilizzando un gel di poliacrilamide al 12% (dimensioni del gel 8 × 6 × 0.1 cm) e un voltaggio costante di 100 V. 10 mg di liofilizzato sono stati solubilizzati con 700 µl di H₂O milliQ e 300 µl di tampone Tris (pH 7.4) 1.33 M contenente glicerolo 40% (v/v), SDS 8% (p/v). La Native-PAGE (7.5% poliacrilamide) è stata condotta come la SDS-PAGE, ma omettendo il detergente SDS dal gel e dal tampone di corsa e utilizzando un voltaggio costante di 80 V. Le aliquote di enzima, solubilizzato con o senza Deriphat destinate alla IEF-PAGE, sono state caricate su delle IPG gel strips (7 cm) con un range di pH 3-10 non lineare. Per l'analisi IEF è stata impiegata una unità Ettan IPGphor IEF (Amersham Biosciences, Italia) utilizzando le istruzioni fornite dal costruttore. La Deriphat-PAGE (D-PAGE) (Rizzi *et al.*, 2003, Santini *et al.*, 1994) è stata eseguita come la N-PAGE, ma in presenza dello 0.1% (p/v) di disodio-N-lauril-β-iminodipropionato (Deriphat) nel tampone di corsa e nella matrice del gel. La separazione è avvenuta utilizzando un gel di poliacrilamide al 10%. 10 mg di liofilizzato sono stati solubilizzati, prima dell'analisi elettroforetica, con lo stesso tampone di corsa contenente Deriphat e addizionati di glicerolo (10% p/v).

3.27 Preparazione del disodio-N-lauril-β-iminodipropionato (Deriphat)

Il sale disodico è stato preparato portando a pH 13 con NaOH 10 M una soluzione al 50% di acido monosodio-N-lauril-β-iminodipropionico (Deriphat 160 C, Henkel, Italia). Il detergente è stato poi fatto precipitare con l'aggiunta di acetone (Fluka, Germania) e quindi liofilizzato, ottenendo una polvere bianca conservata a 4°C.

3.28 Preparazione della soluzione di Deriphat

La soluzione utilizzata per la solubilizzazione del liofilizzato, come tampone di corsa e per l'ottenimento della D-PAGE era costituita da 12.5 mM Tris, 96 mM glicina e 0.1% di Deriphat.

3.29 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (2-DE) della polifenolossidasi

Per la 2-DE, una striscia di gel ottenuta dalla separazione in D-PAGE di 10 µg di estratto enzimatico, è stata tagliata e trattata con 5 ml di glicerolo e 1 ml di tampone Tris (pH 7.4) 1.33 M contenente SDS all'8% (p/v). Successivamente la striscia è stata inserita orizzontalmente nella parte superiore di un gel SDS-PAGE al 12% (p/v) e la corsa è stata eseguita come riportato per la SDS-PAGE. La stessa procedura è stata applicata alle IPG gel strips.

3.30 Zimogrammi dell'attività polifenolossidasi (L-DOPA/MBTH)

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato risciacquato due volte in 50 ml di tampone sodio acetato 10 mM pH 5.0 per 15 min. Successivamente il gel è stato immerso in 50 ml del medesimo tampone in presenza di 3,4-diidrossifenil-L-alanina (L-DOPA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 mM e 3-metil-2-benzotiazolinone idrazone idrocloride idrato (MBTH) (Sigma, St. Louis, MO, USA) 3 mM (Núñez-Delicado *et al.*, 2005). Dopo circa 45 min di agitazione a 25°C, sono comparsi sullo zimogramma delle bande rosa scuro relative all'attività polifenolossidasi (Figura 15). Il gel è stato poi acquisito con una fotocamera digitale.

3.31 Zimogrammi dell'attività polifenolossidasi (tBC/ADA)

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato risciacquato due volte in 50 ml di tampone sodio acetato 10 mM pH 5.0 per 15 min. Successivamente il gel è stato immerso in 50 ml di una soluzione 10 mM di acido acetico avente una concentrazione 25 mM di 4-terz-butil-catecolo (tBC) (Fluka, Steinheim, Germania). Dopo la comparsa di "spots" gialli, il gel è stato lavato con il medesimo tampone; sono stati poi aggiunti 50 ml di una soluzione 10 mM di HCl con concentrazione 25 mM di N,N-dietil-p-

fenilendiammina solfato (ADA) (Fluka, Steinheim, Germania) (Rescigno *et al.*, 1997). La reazione avviene a 25°C e si completa dopo alcuni minuti con la comparsa di bande blu scuro (Figura 16). Il gel è stato poi acquisito con una fotocamera digitale.

3.32 Densitometria degli zimogrammi dell'attività polifenolossidasi

Le immagini digitali degli zimogrammi sono state analizzate con il sistema Gel Doc 1000 (BIO-RAD, Milano, Italia) e studiate densitometricamente con il software Molecular Analyst (BIO-RAD, Milano, Italia).

3.33 Preparazione del campione per l'analisi MALDI-TOF

Degli zimogrammi dell'attività PPO, ottenuti dalla separazione in D-PAGE di 10 µg di estratto enzimatico, sono stati suddivisi in quattro frazioni, ciascuna corrispondente ad ogni singola banda di attività polifenolossidasi. Una striscia invece non è stata frammentata ma lasciata integra e quindi contenente tutte e quattro le bande. In seguito le cinque frazioni sono state omogeneizzate tramite Potter, risospese in H₂O Milli-Q, centrifugate, liofilizzate (Edwards Mini Fast 1700) a - 40°C e conservate in freezer a - 20°C. Ciascuna frazione, una volta liofilizzata è stata risospesa in 220 µl di H₂O Milli-Q e suddivisa in due aliquote da 110 µl. Un'aliquota è stata separata nuovamente in D-PAGE (II^a separazione), mentre l'altra in SDS-PAGE alle condizioni sopra descritte. I gels sono stati poi colorati in Coomassie brilliant blue G250 (Pierce, Rockford, IL, USA). Le striscie di gels ottenute dalla seconda separazione in D-PAGE sono state trattate con 5 ml di glicerolo, 1 ml di tampone Tris (pH 7.4) 1.33 M contenente SDS all'8% (p/v), 5 µl di β-mercaptoetanolo e fatte bollire per 5 min a 100°C. Successivamente la striscia è stata inserita orizzontalmente nella parte superiore di un gel SDS-PAGE al 12% (p/v) e la corsa è stata eseguita come riportato per la SDS-PAGE.

3.34 Digestione con tripsina dei gel colorati in Coomassie

È stata adottata la metodica proposta da Shevchenko *et al.* (1996). I gels di poliacrilamide sono stati lavati con H₂O distillata per 10 min, ripetendo l'operazione 2 volte e gli spots di interesse tagliati. Il tutto è stato trasferito in tubi da microcentrifuga.

I pezzi di gel sono stati lavati con H₂O distillata e NH₄HCO₃ 50 mM/acetonitrile 1+1 (v/v) per 15 min, il liquido rimosso e l'operazione ripetuta un'altra volta, facendo attenzione che la soluzione ricoprisse completamente il campione. L'acetonitrile è stato rimosso e i pezzi di gel reidratati in NH₄HCO₃ 50 mM, dopo 5 min è stato aggiunto un uguale volume di acetonitrile. Dopo un'incubazione di 15 min tutto il liquido è stato rimosso e i pezzi di gel ricoperti con acetonitrile fino al momento della loro disidratazione; i campioni sono stati poi portati a secco tramite centrifugazione sotto vuoto. Per la riduzione e alchilazione dei campioni si è operato nel seguente modo. I pezzi di gel sono stati reidratati in ditiotreitolo 10 mM / NH₄HCO₃ 25 mM, incubati a 56°C per 45 min e lasciati raffreddare a temperatura ambiente. Il liquido in eccesso è stato rimosso, sostituito con lo stesso volume di una soluzione di iodoacetamide 55 mM in NH₄HCO₃ 25 mM e incubato per 30 min a temperatura ambiente al riparo della luce. La soluzione di iodoacetamide è stata rimossa, i frammenti di gel lavati con NH₄HCO₃ 50 mM e acetonitrile (1+1; v/v) per 15 min e addizionati di acetonitrile. I campioni sono stati poi riportati a secco tramite centrifugazione sotto vuoto. Per la digestione “*in-gel*”, i campioni sono stati trattati con 2-3 µl, dipende dalla dimensione degli spot, di una soluzione NH₄HCO₃ 25 mM contenente 5 ng/µl di tripsina e incubati a 37°C per 30 min. Ai campioni è stato aggiunto dell'NH₄HCO₃ 25 mM in modo da tenerli idratati e incubati a 37°C per una notte.

L'estrazione dei peptidi è avvenuta tramite sonicazione per 10 min e recupero del surnatante. Sono stati poi aggiunti 3 µl di acetonitrile 50 % con acido trifluoroacetico all'1 % e il tutto sonicato per altri 10 min recuperando sempre il surnatante. Per l'analisi spettrometrica dei peptidi si è utilizzato un bersaglio AnchorChip e i campioni hanno subito una purificazione in microcolonna.

3.35 Analisi MALDI-TOF.

Le misure sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa Ultraflex II (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Le condizioni strumentali impiegate sono state le seguenti: digeriti triptici: matrice: acido α-ciano-4-idrossicinnamico (soluzione satura in acqua/acetonitrile 50/50 contenente lo 0.1 % di TFA); modo: positive ion, reflectron; IS1 = 25 kV; IS2 = 21.65 kV; delay time = 0 ns; reflectron = 26.3 kV. I digeriti triptici sono stati ripresi con diversi volumi di una soluzione acquosa contenente lo 0.1% di acido trifluoroacetico. 1

μl della soluzione di matrice è stato aggiunto ad 1 μl della soluzione di analita: 1 μl della miscela risultante è stato depositato sul portacampioni e portato a secchezza in aria prima dell'introduzione del target nello spettrometro di massa.

3.36 Ricerca in database

Gli spettri di massa MALDI sono stati analizzati utilizzando il database relativo all'individuazione di modificazioni post-trasduzionali <http://www.expasy.org/tools/findmod/>, basadosi sulla sequenza aminoacidica della proteina con sigla P93622_VITVI (P93622).

3.37 Analisi statistica

Ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte e ne è stata calcolata la media e la deviazione standard. I grafici sono stati realizzati con il software Excel (Microsoft, USA).

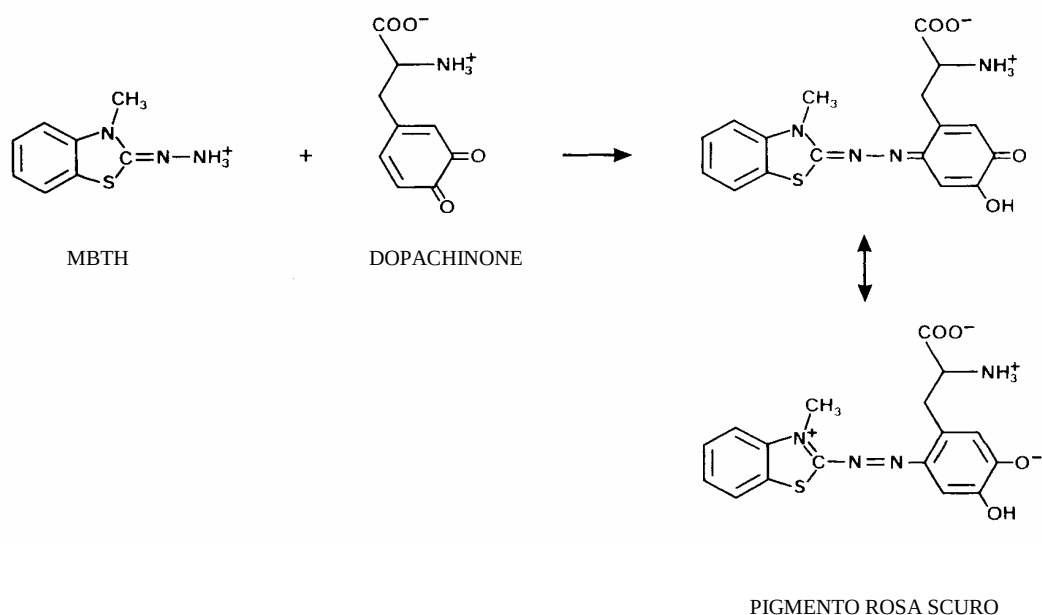


Figura 15. Reazione tra MBTH e DOPACHINONE (Winder & Harris, 1991).

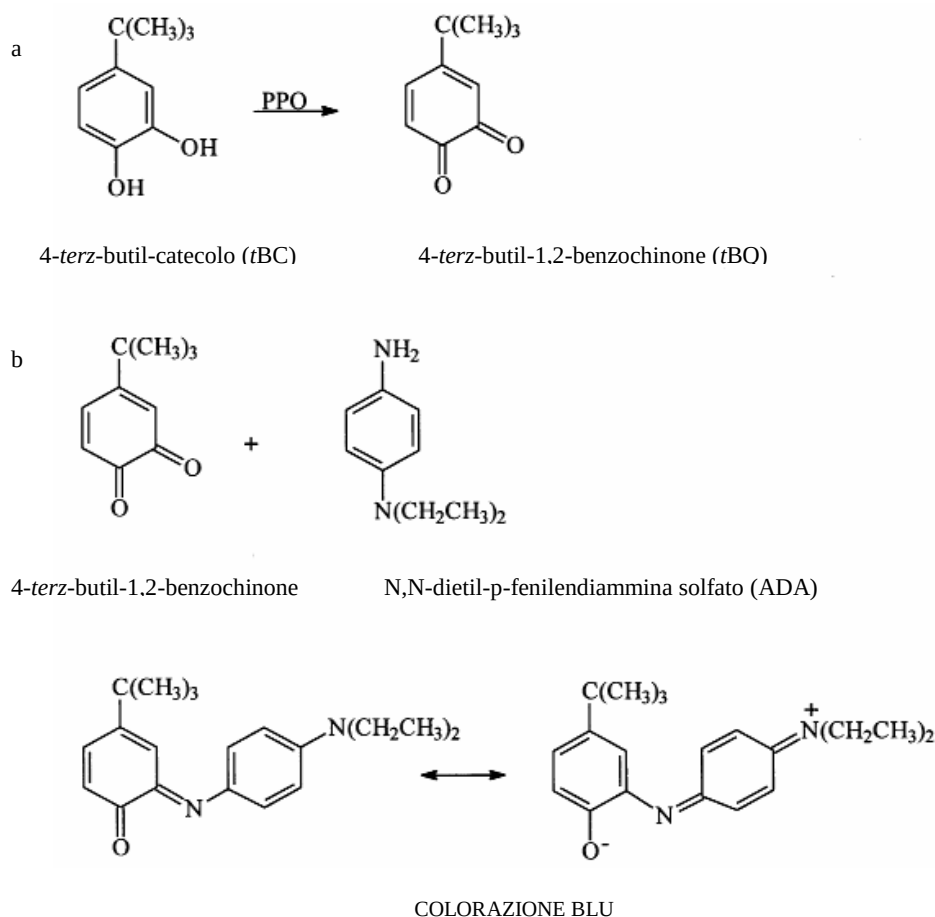


Figura 16. Meccanismo di reazione ipotetico per la formazione del colore blu dato dall'associazione *tBC* e ADA. (a) Ossidazione del 4-terz-butil-catecolo (*tBC*) a 4-terz-butil-1,2-benzochinone (*tBQ*) catalizzata da PPO. (b) Reazione di condensazione che porta alla formazione della base di Schiff.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

PME

L'attività enzimatica era più alta nella varietà Prosecco e mostrava un incremento durante il periodo di insilamento (ALLEGATI - Figura 2). Non sono state trovate differenze significative tra i campioni inoculati con il ceppo commerciale (FR95) e quelli non inoculati (NI). Come riportato precedentemente da (Zocca *et al.*, 2007), i microrganismi isolati dalle vinacce di Moscato e Prosecco non contribuivano alla produzione di PME e alla demetilazione della pectina. Lo zimogramma in gel di pectina (ALLEGATI - Figura 3) mostrava, in tutti i campioni, due bande di attività con la stessa mobilità elettroforetica, a dimostrazione del fatto che i lieviti (presenti nei campioni UVA lavata, T₀ NI, T₁ NI e T_F NI) non contribuiscono alla produzione di PME. Questi risultati sono in accordo con Rombouts & Pilnik (1980), che hanno riportato valori elevati dell'attività PME solo in *Aspergillus niger*. I nostri risultati hanno confermato che l'attività PME era correlata solo al tessuto vegetale e l'incremento dell'attività enzimatica poteva essere dovuto alla degradazione della parete cellulare da parte delle idrolasi microbiche. Il metanolo, il prodotto finale di questa attività enzimatica, raggiungeva i valori massimi nei campioni T_F di Prosecco (ALLEGATI - Figura 4). I risultati mostravano che la presenza del metanolo, poteva essere fortemente legata sia al tempo di insilamento, in accordo con Silva & Malcata (1999) e sia alla varietà d'uva, dimostrando che il più elevato grado di metilazione della pectina del Prosecco (83.09%), maggiore del 18% rispetto al Moscato (67.89%) svolgeva un ruolo fondamentale (dati forniti per comunicazione personale del Dott. Vincenzo Lionetti). Questo risultato, insieme alla più alta attività PME delle vinacce di Prosecco, ha contribuito a chiarire il motivo dell'elevata concentrazione di metanolo nella *Grappa* di Prosecco (1125.9 mg/100 ml a.a.). La comparazione dei livelli di metanolo delle vinacce T_F di Prosecco (ALLEGATI - Figura 4) dopo distillazione con l'impianto pilota, ha mostrato che questo processo non incrementava il contenuto di metanolo nel distillato. Di conseguenza, la presenza del metanolo era riconducibile esclusivamente alla materia prima vegetale. Cortes (2005) ha riportato che il metanolo, data la sua capacità di formare legami idrogeno in ambiente acquoso, rende difficile la sua separazione durante la distillazione. Attualmente, per diminuire la concentrazione di

metanolo nel distillato è necessario ricorrere alla ridistillazione con colonna demetilante, processo che comunque comporta la perdita di una certa quantità di sostanze volatili aromatiche del distillato (Da Porto, 1998).

Un approccio alternativo per il controllo dei livelli di metanolo, potrebbe essere quello di focalizzarsi sui processi di conservazione della vinaccia. Per prima cosa, pianificando i tempi di stoccaggio in funzione della varietà e in particolare, effettuando una breve conservazione per quelle che possiedono sia un'alta attività PME, che un elevato grado di metilazione della pectina. L'utilizzo di brevi tempi di insilamento non rappresenta un ostacolo per la fermentazione della vinaccia, in quanto le nostre prove (dati non riportati) hanno evidenziato nel Prosecco, dopo solo tre giorni, un esaurimento da parte dei lieviti degli zuccheri disponibili. La seconda strategia possibile dovrebbe puntare sull'inibizione dell'attività PME della pianta.

βG

L'aroma è un importante attributo delle bevande alcoliche che derivano dall'uva e molte sono le variabili che contribuiscono alla sua formazione. L'aroma varietale è fortemente connesso all'uva, che viene generalmente classificata in varietà intensamente aromatiche, quali i moscati e quelle aromatiche, definite non-moscato (Mateo & Jimenez, 2000). Anche l'ambiente (suolo, clima) e le tecniche agronomiche giocano un ruolo importante nella definizione dell'aroma. I composti volatili sono presenti sia come forme libere, e principalmente come precursori glicosilati inodori (Ribéreau-Gayon, 2000; Palmeri & Spagna, 2007). Le glicosidasi promuovono il rilascio degli aromi tramite l'idrolisi dei precursori glicosilati. La βG è una delle glicosidasi più interessanti, coinvolte nell'idrolisi enzimatica dei glicosidi terpenici come linalolo, nerolo e geraniolo, che sono i responsabili del carattere varietale di molte uve. I nostri risultati hanno mostrato che l'attività βG del vegetale, determinata nel campione controllo (UVA) delle due varietà, era simile (ALLEGATI - Figura 5). Un consistente incremento dell'attività è stato rilevato nella vinaccia di Prosecco appena spremuta (T_0). Questo era probabilmente dovuto ad un rilascio degli enzimi della pianta e dei microrganismi, ma l'alta concentrazione in zuccheri della vinaccia di Moscato (15% contro l'8% del Prosecco) ha impedito di rilevare una significativa variazione *in vitro*. Come riportato da Saunier *et al.* (1982), il glucosio può essere considerato un inibitore della βG. A

questo riguardo, Pretorius (2000) ha fatto notare che questa ipotesi riguarda solo le β G di origine vegetale, ma non è verificata per quelle microbiche, che invece sono considerate essere etanolo-dipendenti (Mateo & Jimenez, 2000). Durante l'insilamento, un decremento dell'attività, è stato più facilmente misurabile in presenza dell'inoculo del lievito (ALLEGATI - Figura 5). Per rilevare le differenze tra l'attività enzimatica del vegetale e quella microbica, i test *in vitro* si sono dimostrati insoddisfacenti, perché in grado di fornire solo una risposta di tipo quantitativo. Per superare questo ostacolo, è stata realizzata un'analisi zimografica dell'attività β G. L'estratto proteico dei campioni di Moscato e Prosecco è stato analizzato in SDS-PAGE per rivelare l'attività β G (ALLEGATI - Figura 6, pannello A, corsie 1 ÷ 12) utilizzando come substrato la fluoresceina di- β -D-glucopiranoside. Gli zimogrammi hanno mostrato che i campioni non inoculati di Moscato e Prosecco (ALLEGATI - Figura 6, pannello A, corsie 1 ÷ 4, 5, 7, 8) erano simili, con l'eccezione del campione T₀ del Prosecco (ALLEGATI - Figura 6, pannello A, corsia 6). È interessante vedere come le due varietà d'uva hanno mostrato un identico comportamento elettroforetico con i campioni esposti, per tempi differenti, all'attività microbica spontanea. Lambrecht & Pretorius (2000) hanno riportato che i ceppi di lievito selvaggi predominanti sulla buccia dell'uva, in particolare quelli apiculati, possono crescere in condizioni aerobiche e anaerobiche, rilasciando la loro attività β G dallo spazio periplasmico. Da notare, la presenza di un'altra banda nel profilo elettroforetico del campione Prosecco T₀, che potrebbe essere considerata come l'espressione dell'attività microbica selvaggia, la quale viene "mascherata" dal fenomeno di associazione/co-migrazione degli enzimi del vegetale e microbici degli altri campioni. Inoltre, l'elevato contenuto in zuccheri dei campioni di Moscato, potrebbe costituire un ostacolo nella visualizzazione di questa isoforma di β G. I profili zimografici dei campioni inoculati (ALLEGATI - Figura 6, pannello A, corsie 9 ÷ 12), hanno evidenziato un alto numero di bande rispetto agli altri campioni, ma dal punto di vista quantitativo questo aspetto non è stato significativo come mostra la loro bassa attività spettrofotometrica (ALLEGATI - Figura 5). Tenendo in considerazione la differente affinità di substrato tra il saggio spettrofotometrico e quello elettroforetico, la sola eccezione era rappresentata dal campione T₀ del Prosecco (ALLEGATI - Figura 6, pannello, corsia 6), che possedeva la più alta attività β G *in vitro* e un differente profilo elettroforetico, confermando l'ipotesi del rilascio di β G esogene da parte dei lieviti selvaggi. A riguardo della relazione tra l'attività β G e il profilo aromatico, è interessante notare l'effetto della distillazione. Quantitativamente, i terpeni nella *Grappa* di Prosecco

(ALLEGATI - Tabella 1) eccedevano la soglia minima di percezione (Diéguez *et al.*, 2003) e raggiungevano i valori massimi nella *Grappa* di Moscato NI (21.48 ppm, corrispondenti a 26.26 mg/100 ml a.a.). Mateo & Jiménez (2000) hanno riportato che le β Gs di origine vegetale possiedono una bassa influenza sui monoglucosidi dei terpeni degli alcoli terziari (linalolo, α -terpineolo) e sono solo in grado di idrolizzare i monoglucosidi dei terpeni degli alcoli primari (geraniolo, nerolo e citronellolo). I nostri risultati hanno mostrato che: i) dopo la distillazione, la concentrazione di tutti i terpeni aumenta, indipendentemente dalla struttura dell'aglicone; ii) il grande incremento di terpeni liberi sembra dovuto al calore e alle condizioni del processo durante la distillazione (ALLEGATI - Tabella 1). In accordo con Günata (1985) e Da Porto (2002), le glicosidasi dell'uva e/o dei lieviti enologici, sembrano avere solo degli effetti limitati sul rilascio di composti volatili originati dai glicosidi localizzati nella buccia. L'inoculo della vinaccia non sembra essere necessario nell'incrementare e migliorare il profilo dei terpeni della *Grappa*.

EST

L'attività EST è coinvolta nell'idrolisi degli esteri, che sono particolarmente importanti nel definire l'aroma dei distillati. L'attività EST è stata rilevata sia nei campioni di buccia d'uva, nel Moscato era maggiore rispetto al Prosecco, sia nelle vinacce di entrambe le varietà, ai differenti tempi di insilamento, dimostrando sia l'origine vegetale che microbica di questo enzima (ALLEGATI - Figura 7). L'incremento nella concentrazione EST nella vinaccia fresca appena spremuta, corrispondente al campione T_0 , era probabilmente dovuta al rilascio di enzimi vegetali e microbici. Questo risultato era particolarmente evidente nel Prosecco, come riportato in precedenza per l'attività β G, l'altro enzima di origine sia vegetale che microbica. Successivamente, l'analisi spettrofotometrica ha confermato, particolarmente per il Prosecco, la riduzione nell'attività EST in funzione del tempo di insilamento. Questo comportamento è stato osservato nei due campioni di vinacce non inoculati (NI), che hanno mostrato la più alta attività e nella vinaccia inoculata con il ceppo FR95. Gli estratti proteici dei campioni sono stati analizzati elettroforeticamente in condizioni denaturanti, SDS-PAGE, e i risultati hanno evidenziato che l'EST rimanevano attive in presenza del detergente SDS. La buccia dell'uva (U) aveva sempre lo stesso profilo zimografico, indipendentemente

dalla varietà o dal substrato utilizzato (ALLEGATI - Figura 6, pannello B, corsie 1, 5; pannello C, corsie 1, 5; pannello D, corsie 1, 5). La presenza di un'altra banda nei campioni NI della vinaccia di Moscato (ALLEGATI - Figura 6, pannello B e C, corsie 2 ÷ 4) ha dimostrato l'esistenza di diversi isoenzimi. Il profilo zimografico del Prosecco era il medesimo in tutti i campioni (ALLEGATI - Figura 6, pannello B, C e D, corsie 5 ÷ 8), confermando il fenomeno di associazione/co-migrazione elettroforetica degli enzimi del vegetale e microbici, come è stato precedentemente descritto per l'attività β G. Gli estratti proteici sono stati testati, per l'attività EST, con un substrato fluorescente, la fluoresceina diacetato (ALLEGATI - Figura 6, pannello D). I profili zimografici di tutti i campioni, di entrambe le varietà, inoculati con il ceppo di lievito commerciale, hanno mostrato una singola banda fluorescente, in accordo con risultati precedenti (Lomolino *et al.*, 2006). In Figura 8 (ALLEGATI) viene riportato il monitoraggio degli esteri, quali l'acetato di etile e l'etil lattato, presenti nelle vinacce. Come suggerito da Da Porto (2002), la quantità di etil lattato indica probabilmente che la fermentazione lattica non è avvenuta nella nostra prova, causa il breve tempo di insilamento. L'incremento dell'acetato di etile con l'aumentare del tempo di insilamento potrebbe essere dovuto a quattro fattori: 1) una perdita dell'attività idrolitica dell'esterasi in funzione del tempo, particolarmente nel Prosecco; nel Moscato la concentrazione di acetato di etile rimane entro i limiti della soglia di percezione intesa come difetto (Soufleros, 2004); 2) la bassa affinità dell'esterasi nei confronti dell'acetato di etile, che viene poco idrolizzato (Bardi *et al.*, 1993); 3) una contaminazione microbica della materia prima durante il processo di fermentazione (Silva & Malcata, 1998; Jackson, 2002). In accordo con Armstrong *et al.*, (1984), che ha studiato la capacità della *Candida utilis* di convertire l'etanolo in acetato di etile, è stato osservato (dato non riportato) che un lievito selvaggio come la *Candida*, isolato dal campione NI, esibiva un'alta attività esterasica rispetto al ceppo commerciale FR95, *Saccharomyces cerevisiae* (Lomolino *et al.*, 2006). Normalmente l'EST idrolizzano gli esteri nei loro rispettivi costituenti, ma gli stessi enzimi potrebbero essere utilizzati, intervenendo sulle condizioni della reazione, per catalizzarne la sintesi. Una bassa a_w , come quella che si riscontra nella vinaccia, può favorire la sintesi degli esteri. Questo risultato suggerisce un probabile legame tra la concentrazione dell'acetato di etile nelle vinacce NI di Prosecco e l'attività esterasica del lievito selvaggio (ALLEGATI - Figura 7); 4) ultimo fattore, ma non di minore importanza, il ruolo del processo di distillazione. Diéguez *et al.*, (2005), hanno riportato che alte concentrazioni di acetato di etile

possono solo essere il risultato di una non corretta separazione della prima frazione (la testa) durante la distillazione. La concentrazione elevata di questo parametro nelle vinacce T_F di Prosecco (ALLEGATI - Figura 8) è una conferma del ruolo principale dell'attività esterasica. In accordo con Versini (1994), un composto aromatico prende parte direttamente alla formazione dell'aroma, solo se la sua concentrazione eccede l'indice di percezione, e supera il corrispondente limite, definito come il 20% del valore della sua soglia di percezione.

L'acetato di etile è generalmente l'estere maggiormente presente nei distillati, con una soglia di percezione di 180 mg/100 ml a.a. (Soufleros, 2004). Nella *Grappa* di Prosecco questo limite è stato superato, contribuendo a dare un carattere pungente al distillato, insieme ad una sentore di colla e solventi. La presenza di un lievito selezionato ha però modificato la proporzione dell'acetato di etile (ALLEGATI - Tabella 2). In particolare, nel caso del Prosecco, l'inoculo dell'FR95 ha rimediato ad una situazione che sarebbe stata naturalmente incontrollabile, con delle concentrazioni di acetato di etile nel distillato maggiori di 800 mg/100 ml a.a. (ALLEGATI - Tabella 2). Riguardo a questo aspetto sono comunque necessari ulteriori studi per verificare la reale utilità dell'inoculo di ceppi selezionati.

Di grande interesse sono anche gli esteri che derivano dagli alcoli superiori, quali l'acetato di isoamile, uno degli agenti responsabili dell'aroma di frutta, e il fenil etil acetato, che conferisce un aroma di rosa. Lambrechts & Pretorius, (2000), ascrivono al metabolismo dei lieviti la produzione degli alcoli superiori e sono considerati i maggiori responsabili dell'aroma secondario dei distillati.

I nostri risultati hanno mostrato che la quantità di alcol isoamilico presente era pressochè nulla in entrambe le varietà (dati non riportati). La concentrazione di fenil etanolo era invece simile nelle due varietà di vinaccia (16.89 mg/100 ml a.a. per il Moscato; 26.53 mg/100 ml a.a. Prosecco). In ogni caso, dopo la distillazione, la sua presenza era significativa solo nella *Grappa* di Moscato (13.53 mg/100 ml a.a.). Per quanto riguarda questo aspetto i nostri risultati hanno indicato che la distillazione può svolgere un effetto negativo.

Per ultimo, comparando i parametri dell'analisi sensoriale, riferiti ai campioni NI e FR95 delle due varietà, solo la *Grappa* di Prosecco ha mostrato significative differenze ($p < 0.05$), probabilmente dovute al carattere pungente del distillato che possedeva un sentore di colla e solventi, causato dall'alta concentrazione di acetato d'etile.

Inibizione PME

Partendo dal presupposto, che i lieviti, isolati dall'uva e dalla vinaccia di Prosecco, non contribuiscono alla produzione di PME o alla modificazione delle pectine, coinvolte nel rilascio di metanolo nella vinaccia (Zocca *et al.*, 2007; Rombouts & Pilnik, 1980; ALLEGATI - Figura 2). La ricerca si è focalizzata sullo studio di alcuni possibili inibitori della PME di Moscato e Prosecco. Nell'industria delle bevande, nella quale questo enzima è conosciuto per essere il responsabile della perdita di torbidità di alcuni succhi di frutta e vegetali, i processi termici convenzionali e, in misura minore, i trattamenti alle alte pressioni sono gli approcci più utilizzati nel controllo dell'attività PME (Parish, 1998). L'analisi bibliografica mostra che diversi composti chimici sono in grado di inibire l'attività PME. A questo riguardo, Fayyaz *et al.* (1995) hanno riportato che la PME di papaia era inibita dal saccarosio, Alonso *et al.* (1996) hanno dimostrato la capacità inibitoria dell'acido D-(+)-galatturonico nei confronti della PME di ciliegia dolce, Körner *et al.* (1980) hanno provato che le diverse frazioni enzimatiche di PME erano inibite dall'EDTA, e un'inibizione competitiva della PME da parte del CaCl_2 è stata verificata da Charnay *et al.* (1992). Recentemente, è stata riportata la presenza di inibitori della PME provenienti da varie piante, ed è stato iniziato un nuovo ciclo di studi. In particolare, la scoperta di un potente inibitore proteico (PMEI) della PME, in frutti maturi di kiwi (*Actinidia chinensis*) da parte di Balestrieri *et al.* (1990) ha creato nuove opportunità nel controllo dell'attività di PME endogene. In accordo con Ly-Nguyen *et al.* (2004), l'inibitore PMEI da kiwi, il quale inibisce effettivamente la PME in un intervallo di pH compreso tra $3.5 \div 7.5$, è specifico per la PME ed è attivo nei confronti di diverse PME di origine vegetale come quelle di arancia, pomodoro, mela, banana e patata. Per capire se il PMEI fosse capace di inibire anche la PME dell'uva, sono state condotte diverse prove sugli estratti d'uva, impiegando come confronto, altri inibitori come l' Na_2EDTA , CaCl_2 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)\text{Cl}$, saccarosio e acido D-(+)-galatturonico. I risultati hanno indicato che, non solo il PMEI è in grado di inibire completamente la PME, ma è anche l'unico inibitore, tra quelli testati, efficace nei confronti degli estratti enzimatici di Moscato e Prosecco (ALLEGATI - Figura 9 a, b e Tabella 3). Il PMEI è stato anche testato su mosto d'uva e vinaccia Moscato (ALLEGATI – Figura 10 a, b) in condizioni ambientali simili a quelle che si possono

trovare normalmente in cantina e distilleria. L'analisi HS-SPME-GC, in presenza dell'inibitore, ha mostrato un decremento dell'8.5% nella formazione del metanolo nel mosto. Nel caso della vinaccia, a 14 giorni di incubazione è stata determinata una riduzione del metanolo del 16.6%, dopo invece 28 giorni di incubazione l'inibizione si è attestata tra il 19.5% e il 33.3%. I risultati ottenuti, confermati utilizzando sia l'inibitore naturale che il ricombinante da *P. pastoris*, dimostrano che l'inibitore di kiwi può trovare un vantaggioso utilizzo industriale nella riduzione di metanolo in mosti di uva e vinacce ed in particolare nei prodotti ottenuti dalla fermentazione e/o distillazione degli stessi, quali vini e distillati (Brevetto PD2007A000065). I risultati migliori sono stati ottenuti incubando i mosti di uva con almeno 1 parte di inibitore in rapporto a 20000 parti di mosto, alla temperatura di 30°C per un tempo di almeno 7 giorni. Le condizioni ideali per ridurre la formazione di metanolo nelle vinacce sono perciò 1 parte di inibitore in rapporto a 2000 parti di vinaccia, alla temperatura di 30°C per un periodo di insilamento compreso tra 14 e 28 giorni.

L'impiego del PMEI ricombinante è sicuramente da preferirsi data la sua elevata economicità. L'eliminazione del PMEI, una volta esplicata la sua azione, potrebbe avvenire con i trattamenti di stabilizzazione proteica nel caso del vino, e con la distillazione nel caso delle vinacce.

PPO

Resa di estrazione

Per ottenere degli estratti parzialmente purificati idonei alle analisi elettroforetiche, è stato necessario tenere in considerazione il “problema” della composizione dei tessuti vegetali, caratterizzati dall'elevato contenuto in polifenoli e dalla bassa quantità di proteine oltre che dalle caratteristiche della PPO, che viene facilmente inibita dagli agenti riducenti. Inizialmente è stato deciso di escludere gli agenti riducenti dal tampone di estrazione e di includere nel mezzo il PVPP, che impedisce le reazioni di aggregazione tra le proteine ed i polifenoli. I risultati hanno mostrato che è possibile non solo mantenere l'attività enzimatica nell'estratto, ma con il protocollo messo a punto da Zocca *et al.*, (2007) ottenere anche una resa d'estrazione rispettivamente di 1.039 e 1.105 mg proteina per grammo di uva Moscato bianco e Prosecco (ALLEGATI

- Figura 11). È stata comunque effettuata una prova di estrazione utilizzando il medesimo tampone con l'aggiunta di un riducente, il β -mercaptoetanololo, ma la resa era solo l'8% più elevata rispetto al tampone, senza questo componente. Questo piccolo incremento della resa non giustificava l'aggiunta di un agente riducente, che avrebbe potuto influire sull'attività PPO dell'estratto. Fan *et al.* (2005) hanno riportato un incremento del 25% nell'attività PPO di mela in presenza di concentrazioni 0 ÷ 2 M di NaCl. Nel nostro tampone di estrazione è stato quindi deciso di includere questo sale, seguendo anche le indicazioni di Valero & García-Carmona (1998), che lo indicano quale attivatore della PPO a pH superiori a 5. Dopo l'estrazione, i campioni sono stati liofilizzati senza riportare nessuna perdita dell'attività dovuta allo stress da liofilizzazione, come dimostrato da Weemaes *et al.* (1998). Negli estratti di Moscato e Prosecco è stata valutata la presenza dell'attività catecolasica e cresolasica. L'attività catecolasica ha mostrato valori simili nelle due varietà, mentre nel Moscato l'attività cresolasica era il 54% più alta rispetto al Prosecco (ALLEGATI - Tabella 4). Questi risultati sono in accordo con altri riportati in letteratura (Traverso-Rueda & Singleton 1973), sebbene Sharma *et al.* (2001) abbiano riscontrato una bassa attività cresolasica rispetto a quella catecolasica in alcune cultivars di mango, probabilmente dovuta a una grande instabilità dell'enzima e perdita durante la fase di estrazione. In base a questi risultati si è scelto di focalizzare lo studio sull'attività catecolasica, così da poter confrontare le risposte di entrambe le varietà, in termini di stabilità termica, optimum di pH ed efficienza degli inibitori.

Effetto del pH e della temperatura sull'attività catecolasica

Gli estratti enzimatici di Prosecco e Moscato hanno manifestato la massima attività catalitica, rispettivamente a pH 5.0 e 5.5 (ALLEGATI - Figura 12 a) intervallo ritenuto ottimale per la PPO dell'uva anche da Rapeanu *et al.*, (2006). A pH inferiori a 3 e superiori a 8 entrambi gli enzimi perdevano la loro attività. Per succhi d'uva e vino che raggiungono pH 4, la PPO al 50% della sua attività massima può comunque diventare temibile. L'estratto enzimatico risultava sostanzialmente stabile tra i 25°C ed i 40°C, intervallo di temperatura uguale a quello riportato da Sanchez *et al.*, (1988) per la PPO di uva Monastrell, ma più ampio rispetto a quelli indicati da altri autori in uve Concord, Ravat e Niagara (Rapeanu *et al.*, 2006) (ALLEGATI - Figura 12 b). L'enzima di entrambe le varietà era completamente inattivato dopo 15 min di riscaldamento a 70°C

rispetto ai 4 min riferiti da Aydemir (2004) per denaturare la PPO del carciofo. In base a questi risultati, la temperatura non sembra il mezzo più appropriato per controllare la PPO di Moscato e Prosecco in quanto tempi così lunghi di trattamento, aumentano inevitabilmente il danno termico.

Inibizione chimica della PPO

Gli estratti d'uva parzialmente purificati e caratterizzati sono stati trattati con alcuni inibitori normalmente impiegati nell'industria alimentare. Nel corso degli anni sono state sviluppate numerose tecniche e meccanismi per il controllo dell'imbrunimento enzimatico. Questi processi hanno lo scopo di "eliminare" uno o più delle componenti essenziali alla reazione quali, l'ossigeno, l'enzima, il rame o i substrati. Dal punto di vista tecnologico, Weemaes *et al.* (1998) riportano che il trattamento termico (*blanching*) è il metodo migliore per il controllo dell'imbrunimento enzimatico. Esso comunque causa dei cambiamenti a livello della struttura dei tessuti (*textural changes*) e può portare alla formazione di odori non desiderati (*off-flavours*). È noto anche che l'inattivazione della PPO per mezzo del calore è inadatta per alcuni prodotti come i succhi contenenti antocianine, poiché le temperature richieste possono deteriorare queste molecole. L'utilizzo di composti a base di solfito di sodio o potassio, rappresenta uno dei metodi più comuni, ma il loro effetto sulla salute ha portato a cercare di sostituirli. Altri composti chimici come gli acidificanti (acido citrico), chelanti (Na_2EDTA) e agenti riducenti (acido ascorbico, solo o combinato con l'acido citrico) sono stati testati e determinata la loro capacità inibitoria nei confronti della PPO dell'uva (ALLEGATI - Figura 12, 13). Studiando l'effetto di alcuni inibitori sull'attività PPO dei due estratti è emerso che alla concentrazione più bassa (5 mM), il sodio metabisolfito era l'additivo più efficace in entrambe le varietà (ALLEGATI - Figura 12 a, b), mentre erano necessarie dosi più elevate (15 mM) per ottenere i medesimi risultati anche con l'acido ascorbico, utilizzato singolarmente o in sinergia con l'acido citrico (ALLEGATI - Figura 14 a, b), altrimenti poco efficace (Zocca *et al.* 2007). Se per questi due inibitori risultava chiara la stretta dipendenza tra dose ed effetto, un'analisi comparativa tra i diversi composti non può trascurare che il meccanismo di inibizione è sostanzialmente diverso. Nel caso dei solfiti si basa sia sulla formazione di complessi con i chinoni che ne prevengono la polimerizzazione sia sul legame col sito attivo dell'enzima. Per l'acido ascorbico è più corretto parlare di un suo ruolo come

antiossidante sui chinoni ridotti a difenoli incolori, più che di un inibitore enzimatico. L'acido citrico contribuisce a mantenere il pH al di sotto dell'optimum richiesto dall'enzima, ostacolando più che inibendone l'attività. L'EDTA, è poco efficace, come riportato da altri autori nel caso della pesca (Luh & Phithakpol, 1972) e dell'avocado (Kahn, 1976). Le analisi hanno anche indicato la necessità di sviluppare dei metodi di inibizione più efficaci e altri tipi di approccio al problema dell'imbrunimento enzimatico. Come suggerito da Shimazaki *et al.* (2004), una combinazione dell'attività e della sequenza strutturale dell'enzima, potrebbe essere utilizzata per creare dei profili enzimatici in 2-DE in condizioni non denaturanti, verificando la possibilità di inibizione specifica oppure no. Le informazioni ottenute potrebbero essere utili nel realizzare dei metodi per il controllo dell'imbrunimento, in modo da incrementare la qualità anche dei prodotti e delle bevande derivate dall'uva.

Elettroforesi della PPO

Valutando i risultati precedentemente ottenuti con la PPO è stata tentata la visualizzazione dell'attività in SDS-PAGE (Núñez-Delicado *et al.* 2005, Núñez-Delicado *et al.* 2007), una tecnica considerata denaturante secondo Mayer & Harel (1991). Nel nostro caso, la PPO di entrambe le varietà è stata rivelata in SDS-PAGE (ALLEGATI - Figura 15, pannello A, corsie a e b). Confermando quanto riportato da Moore & Flurkey (1990) secondo i quali la PPO, oltre a non essere denaturata dall'SDS, può essere attivata da questo detergente. Questi autori ipotizzano un cambiamento conformazionale nella struttura dell' "enzima latente", dal momento che può esistere sia in forma inattiva che "latente". Il profilo elettroforetico dei campioni di Moscato presentava una banda in più rispetto al Prosecco, sebbene la quantità di proteina caricata ($\approx 10 \mu\text{g}$) nel gel fosse la stessa per entrambe le varietà. L'attività enzimatica negli estratti di Prosecco risultava maggiormente definita, probabilmente a causa di una differente affinità di substrato (Allegati - Figura 15, pannello A, linea b). Verificata la possibilità di visualizzare l'attività PPO in SDS-PAGE, il successivo step è stato quello di risolvere le singole bande in spot utilizzando una tecnica 2-DE non denaturante. L'elettroforesi in condizioni native dei campioni delle due varietà (ALLEGATI - Figura 15, pannello B) ha dato dei risultati negativi. Questo comportamento elettroforetico poteva essere dovuto alla localizzazione cellulare dell'enzima. La PPO, infatti, è frequentemente associata ai tilacoidi e il suo possibile coinvolgimento nella fotosintesi e

nelle reazioni ad essa correlate è stato discusso da Tolbert (1973), Vaughn & Duke (1984). Tenendo in considerazione questo aspetto, altri autori che hanno studiato i complessi proteici dei tilacoidi utilizzando separazioni elettroforetiche (Markwell *et al.* 1979, e Gregory *et al.* 1982), hanno ottenuto i migliori risultati impiegando il detergente Deriphat. Il Deriphat è un detergente zwitterionico capace di rompere gli aggregati proteici senza causarne la denaturazione. Inoltre, come riportato da Markwell *et al.* (1979), il Deriphat possiede la capacità di migrare insieme al tampone di corsa, mantenendo la solubilità delle proteine. Questi motivi sono stati alla base della scelta dell'utilizzo del Deriphat come detergente, garantendo all'enzima di rimanere solubile durante la migrazione elettroforetica. La Figura 15 degli allegati (pannello B) mostra i risultati della N-PAGE di Moscato e la sua separazione elettroforetica ottenuta con l'addizione del Deriphat al tampone di corsa (corsia b), in accordo con Rizzi *et al.* (2003) e Santini *et al.* (1994). Per il Prosecco, è stato ottenuto lo stesso risultato. Per questa ragione, si è deciso di includere il Deriphat durante la polimerizzazione dell'acrilamide così come avviene normalmente per l' SDS durante l' SDS-PAGE (ALLEGATI - Figura 15, pannello C, corsie a ÷ d). La buona risoluzione elettroforetica può essere dovuta anche alla presenza dell'agente surfattante impiegato nella medesima concentrazione nel tampone di corsa, nei gels e nella solubilizzazione dei campioni di liofilizzato. Il metodo utilizzato ha permesso di visualizzare i profili elettroforetici delle PPO degli estratti di Moscato e Prosecco in condizioni native, considerate un passaggio fondamentale per la realizzazione di una 2-DE. Grazie a questa tecnica, con l'impiego di vari substrati e coloranti, è stato possibile anche comparare le diverse isoforme ottenute dai profili elettroforetici. I gels mostravano chiaramente che, nonostante il numero delle bande fosse lo stesso in tutti e quattro i campioni, le intensità erano differenti. Queste differenze sono state quantificate per mezzo dell'analisi densitometrica, e le relative quantità di proteina in ciascuna banda, comparate con il profilo proteico totale (ALLEGATI - Figura 16). I dati hanno evidenziato l'assenza di un effetto legato alla varietà dell'uva, in quanto i diversi comportamenti a livello zimografico dipendevano dal tipo di substrato utilizzato. In particolare, la prima banda aveva un'alta affinità per il tBC e la quarta era più affine per L-DOPA. Per le altre bande non sono state evidenziate differenze significative (ALLEGATI - Figura 16). Viste le differenze dei profili zimografici tra la D-PAGE e l' SDS-PAGE, la 2-DE aveva lo scopo di studiare questo diverso comportamento elettroforetico. Le quattro isoforme trovate con la D-PAGE sono state risolte in spots senza perdere la loro attività catalitica,

anche dopo la separazione bidimensionale (ALLEGATI - Figura 17 a, b). Nel Prosecco, la prima, seconda, e quarta banda della D-PAGE erano costituite da due forme isoenzimatiche comigranti (ALLEGATI – Figura 17 b), ognuna delle quali dava origine a due spots nella 2-D-PAGE. Mentre, nel Moscato, solo la quarta banda ha mostrato lo stesso comportamento (ALLEGATI – Figura 17 a). Una comparazione tra l'SDS-PAGE e la 2-DE di Prosecco e Moscato ha dimostrato che gli spots allo stesso livello erano forme isoenzimatiche che comigravano nell'SDS-PAGE. Nel Moscato è stata riscontrata l'assenza di una banda dell'SDS-PAGE nella rispettiva 2-DE, probabilmente per una mancata solubilizzazione dell'isoenzima. Per confermare la maggiore efficienza separativa della D-PAGE e dell'SDS-PAGE (2-DE) rispetto alla 2-DE tradizionale, è stata condotta un'altra prova utilizzando la tecnica IEF per la separazione in prima dimensione. I profili elettroforetici ottenuti mostravano un minor numero di spots, a dimostrazione dell'alta capacità di separazione della D-PAGE e SDS-PAGE (2-DE) nell'isolare le diverse isoforme di PPO dagli estratti d'uva (ALLEGATI – Figura 17, c, d) (Beranova-Giorgianni, 2003). Dalla comparazione con la D-PAGE, si nota che l'IEF-PAGE non garantisce una risoluzione spaziale necessaria per un'efficiente separazione delle diverse isoforme di PPO.

Separazione delle proteine delle bande zimografiche ottenute in Deriphat-PAGE

L'utilizzo del Potter ha permesso di estrarre le proteine che costituivano ogni singola banda zimografica in Deriphat-PAGE (Allegati – Figura 18). L'estratto proteico di ciascuna delle quattro bande e quello corrispondente all'insieme delle quattro isoforme sono stati ri-separati in Deriphat-PAGE e in SDS-PAGE, in quest'ultimo caso dopo bollitura in condizioni riducenti, e separati nuovamente in 2-DE (ALLEGATI – Figure 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25). Questo procedimento ha permesso, dopo la colorazione in Coomassie brilliant blue, di separare ulteriormente le proteine che costituivano ogni singola isoforma enzimatica e quindi di scomporla in tutte le sue componenti.

MALDI-TOF

Gli spots, separati tramite le 2-DE ottenute dalle singole bande zimografiche in Deriphat-PAGE, sono stati tagliati e digeriti con tripsina, analizzando i prodotti tramite analisi MALDI-TOF. Sono stati ottenuti diversi spettri rivelando la presenza di ioni

differenti e di ioni comuni corrispondenti ai vari spots. La ricerca ha evidenziato che alcuni di questi appartenevano alla sequenza a.a. della PPO con “*cleavage*” in zone aminoacidiche 381-386-553-558-444-450, le ultime due con presenza di fosfato. Sono stati messi in evidenza anche altri tipi di modifiche post-trasduzionali, in particolare si è visto che le differenze maggiori sono localizzate nei siti di fosforilazione, che come mostrato in Tabella 5 (ALLEGATI), sono in posizioni diverse della sequenza aminoacidica; si tratta probabilmente di una proteina costituita da diverse isoforme con siti di modificazione post-trasduzionale.

5. CONCLUSIONI

I risultati originali ottenuti da questo lavoro possono essere utili, se non a chiarire completamente, per lo meno a circoscrivere le problematiche iniziali. Il primo obiettivo che ci si era proposti ruotava intorno alla relazione esistente tra attività enzimatiche, qualità della materia prima e del prodotto finito, in questo caso la *Grappa*. Utilizzando un approccio biochimico è stato possibile studiare l'evoluzione nell'uva e nella vinaccia delle due varietà autoctone considerate, di PME, β G ed EST, tre enzimi di notevole importanza tecnologica, stabilendone l'origine vegetale o microbica.

A questo proposito, è emerso in modo netto il ruolo della PME vegetale nel rilascio di metanolo nella vinaccia e poi nella *Grappa* (Zocca *et al.*, 2007). Inoltre è stato possibile stabilire una chiara relazione tra l'attività PME delle vinacce, il grado di metilazione della pectina, che è dipendente dalla varietà, e la concentrazione di metanolo prima e dopo la distillazione.

L'individuazione della PME vegetale come attore principale nella formazione di metanolo è stata fondamentale per impostare una strategia di controllo. Tra i diversi inibitori enzimatici testati, i risultati più interessanti sono stati ottenuti con la PMEI, una proteina estratta dal kiwi. Le diverse prove effettuate su mosti e vinacce hanno permesso di mettere a punto un metodo brevettato (PD2007A000065) basato sull'effetto inibitorio della PMEI per ridurre la produzione di metanolo durante il processo di insilamento della vinaccia. Inoltre la possibilità di utilizzare il PMEI ottenuto per via ricombinante da *Pichia pastoris*, economico e semplice da produrre, aumenta le prospettive di una sua applicazione su scala industriale.

Per quanto riguarda la β G, l'enzima è sia di origine vegetale che microbica. I risultati ottenuti mettono però in discussione il ruolo che entrambe queste attività possono avere nel rilascio di composti aromatici nella *Grappa*. Sembra infatti che calore e condizioni di processo durante la distillazione siano fondamentali per aumentare in modo consistente la dotazione terpenica del distillato. Per contro, le glicosidasi dell'uva e/o dei lieviti, sembrano avere un effetto limitato sul rilascio di composti volatili aromatici nell'uva e nella vinaccia.

Le EST rimangono un problema aperto. È infatti molto difficile dare un'interpretazione univoca degli effetti di questi enzimi che, come le β G sono sia di origine vegetale che microbica.

Per quanto riguarda lo studio della PPO, è stato dimostrato come possa essere promettente l'approccio "proteomico" nell'individuazione di validi inibitori enzimatici. A corollario sono stati ottenuti altri interessanti risultati: i) la messa a punto di un efficiente e specifico processo di estrazione in grado di garantire l'attività catalitica, ii) la produzione di un estratto enzimatico liofilizzato, facilmente conservabile e perfettamente stabile nel tempo, iii) la dimostrazione che la PPO di uva Moscato bianco e Prosecco ha le medesime caratteristiche di stabilità chimico-fisica delle PPO di altri vitigni internazionali.

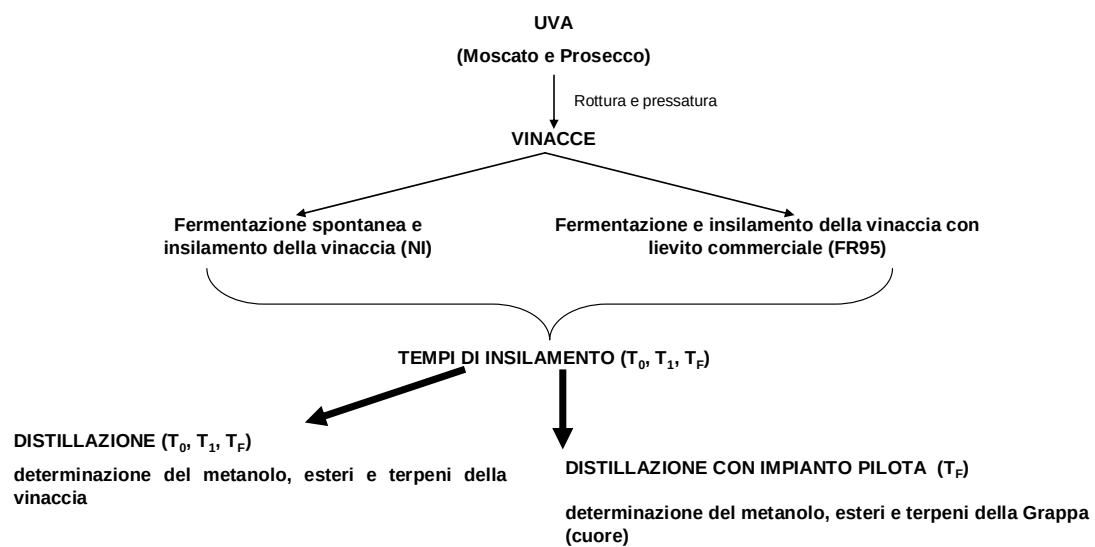
Grazie all'analisi elettroforetica è stato possibile risolvere numerosi problemi riguardanti la solubilità del campione e di conseguenza la sua mobilità in condizioni native. L'utilizzo della tecnica bidimensionale ha confermato come questo metodo possa essere valido anche nello studio di enzimi estratti da matrici vegetali.

Il particolare approccio di tipo elettroforetico ha consentito in una prima fase di risolvere i problemi riguardanti la solubilità del campione e di conseguenza la sua mobilità anche in condizioni native.

La separazione delle proteine con la tecnica 2-DE rappresenta a tutt'oggi, uno step fondamentale che precede l'analisi MALDI-TOF e quella bioinformatica.

In base a questi presupposti una combinazione dell'attività e della sequenza delle strutture proteiche, potrebbe essere utilizzata per creare dei profili enzimatici non denaturanti in 2-DE, in modo da verificare l'effettiva inibizione specifica dell'attività PPO considerata. Le informazioni ottenute, avrebbero sicuramente anche una ricaduta pratica. Non si può dimenticare infatti che la PPO è l'enzima responsabile delle maggiori perdite in post-raccolta.

ALLEGATI



(a)



(b)

Figura 1. (a) Schema della preparazione, conservazione e distillazione delle vinacce di Moscato e Prosecco. (b) Impianto pilota utilizzato per la distillazione delle vinacce T_F .

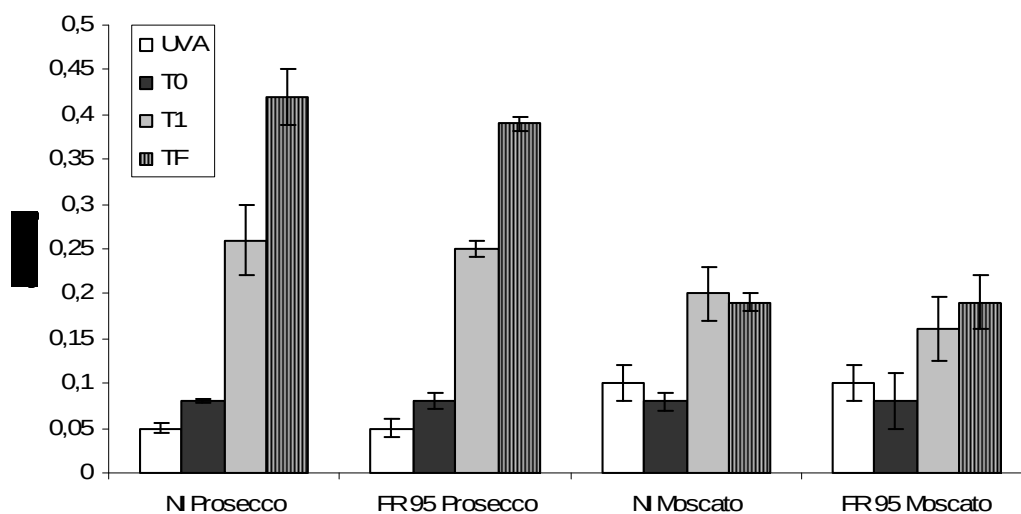


Figura 2. Attività PME espressa come Δ assorbanza/min/g vinaccia Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95, calcolata sugli estratti vegetali . prelevati ai diversi stadi di conservazione (UVA, T₀, T₁ e T_F).

UVA T₀ NI T₁ NI T_F NI

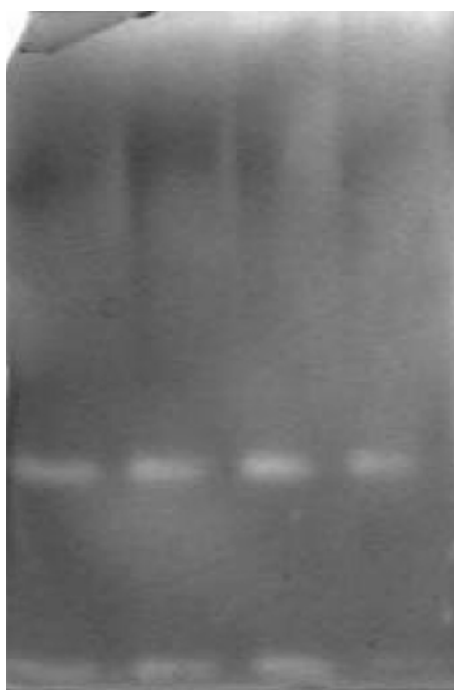


Figura 3. Zimogramma dell'attività PME degli estratti vegetali di vinaccia Prosecco prelevati ai diversi stadi di conservazione (UVA lavata, T₀ NI, T₁ NI e T_F NI); i profili zimografici sono stati ottenuti separando i campioni in N pectina PAGE, T 10% e visualizzati con il rosso rutenio.

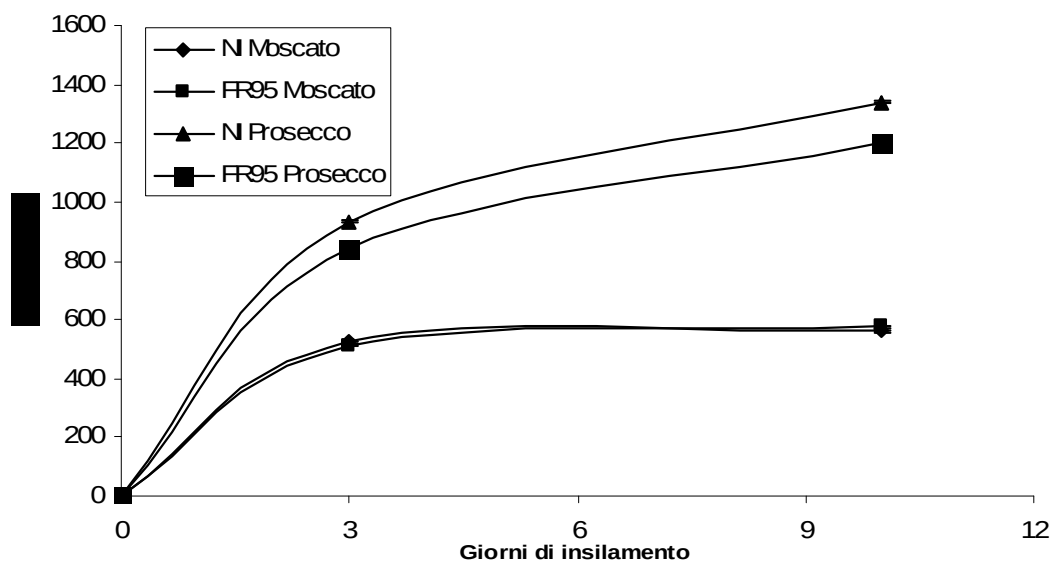


Figura 4. Evoluzione del metanolo (mg/100 ml a.a.) prodotto durante la conservazione delle vinacce di Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95.

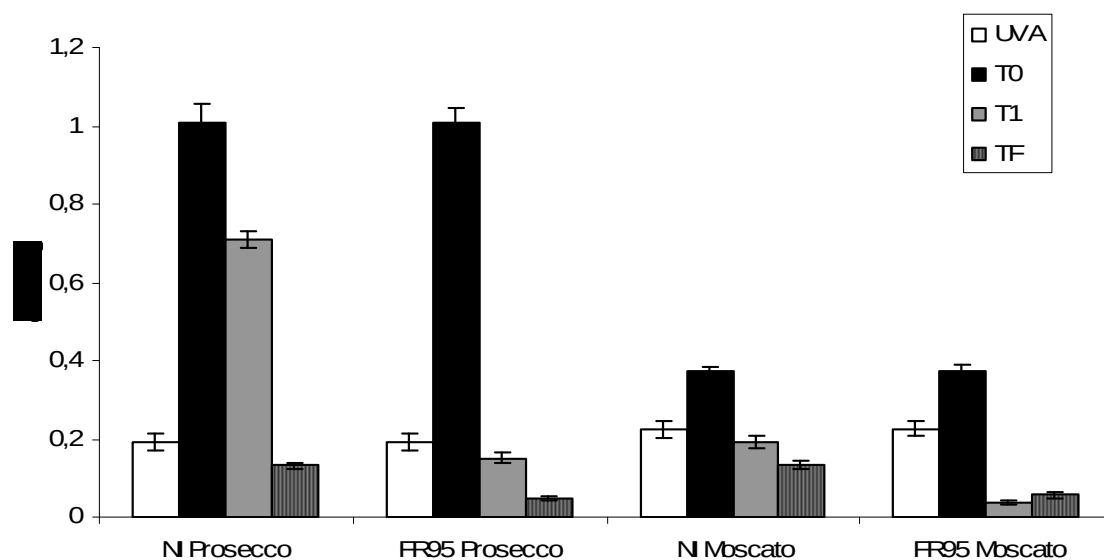


Figura 5. Attività β G espressa come Δ assorbanza/min/g vinaccia Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95, calcolata sugli estratti vegetali . prelevati ai diversi stadi di conservazione (UVA, T₀, T₁ e T_F).

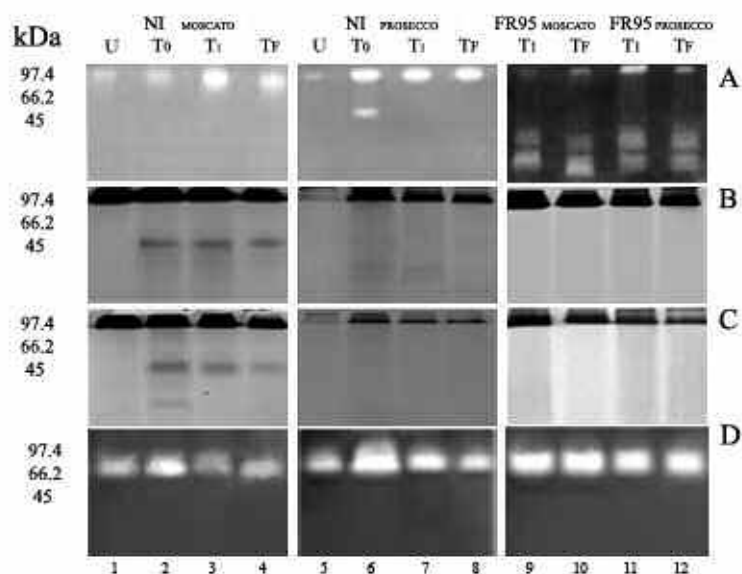


Figura 6. Zimogrammi in SDS-PAGE delle attività β G (A) e ESTs (B, C, D) delle vinacce di Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95 ai vari stadi di conservazione, T 16%.

Terpeni	Vinacce Moscato		Vinacce Prosecco		Grappa Moscato		Grappa Prosecco	
	NI	FR95	NI	FR95	NI	FR95	NI	FR95
Citronellolo	1.533±0.045	1.53±0.038	0.128±0.012	0.121±0.011	4.647±0.081	4.725±0.090	0.367±0.021	0.406±0.036
Geraniolo	1.902±0.051	1.455±0.041	0.346±0.022	0.293±0.023	5.72±0.065	4.34±0.072	0.794±0.068	0.841±0.079
Linalolo	2.96±0.063	2.802±0.071	0.29±0.018	0.147±0.015	9.58±0.108	8.525±0.102	0.705±0.045	0.553±0.045
α-Terpineolo	0.585±0.021	0.475±0.019	0.000	0.000	1.529±0.052	1.299±0.055	0.134±0.021	0.109±0.011

Tabella 1. Concentrazione dei terpeni (ppm) nelle vinacce (T_F) e nella *Grappa*.

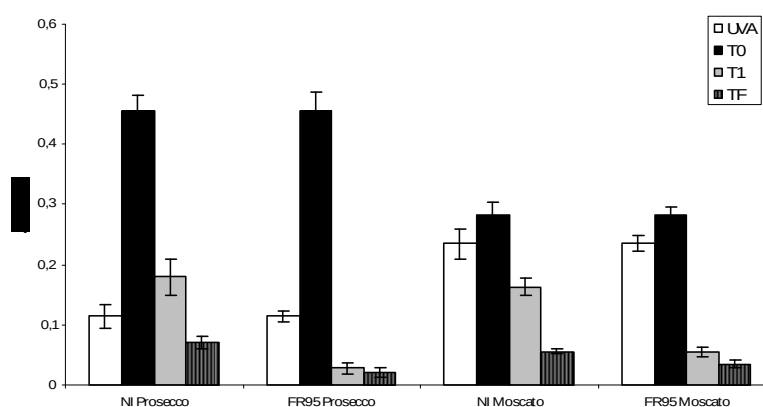


Figura 7. Attività EST espressa come Δ assorbanza/min/g vinaccia Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95, calcolata sugli estratti vegetali, prelevati ai diversi stadi di conservazione (UVA, T_0 , T_1 e T_F).

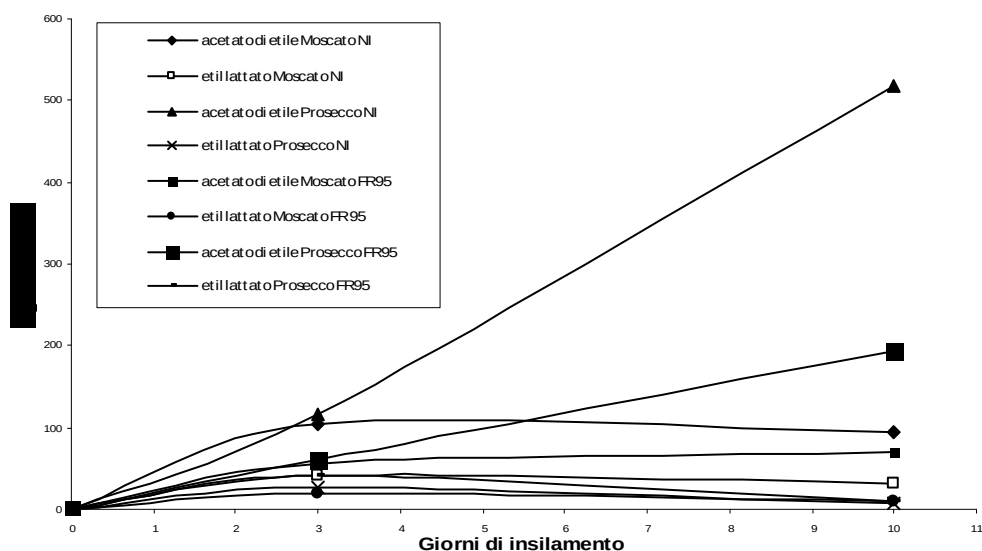


Figura 8. Evoluzione degli esteri (mg/100 mL a.a.) prodotti durante la conservazione delle vinacce di Moscato e Prosecco NI e inoculate con il ceppo di lievito FR95.

Esteri	Vinacce Moscato		Vinacce Prosecco		Grappa Moscato		Grappa Prosecco	
	NI	FR95	NI	FR95	NI	FR95	NI	FR95
Acetato di etile	95.48±10.7	70.91±9.9	516.58±31.6	193.01±15.9	102.43±21.9	74.71±23.6	821.46±45.9	128.05±21.6
Etil lattato	32.54±8.6	102.91±15.2	7.53±1.8	9.05±2	12.6147±2.6	6.16±1.2	71.91±15.6	58.01±17.3

Tabella 2. Concentrazione degli esteri (mg/100 ml a.a.) in vinacce (T_F) e Grappa.

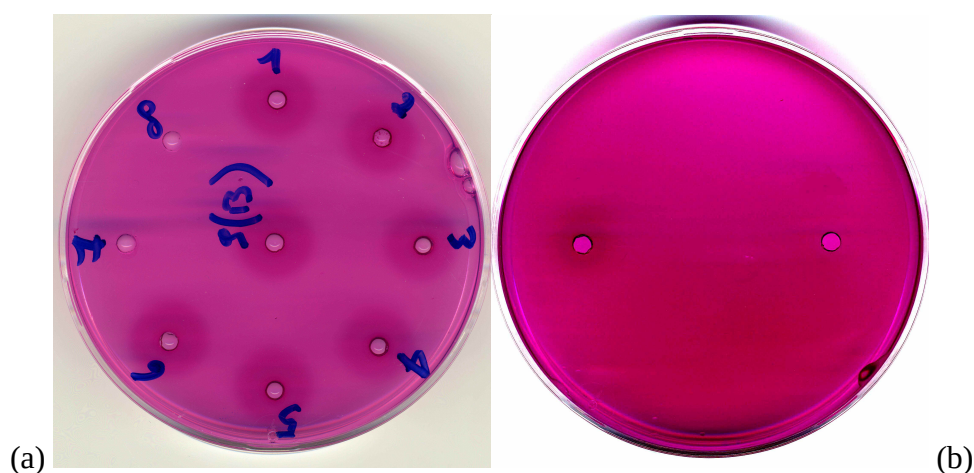


Figura 9. (a) Saggio dell'attività PME di Moscato incubata con (pozzetti 1÷7) o senza (pozzetto 9) inibitori. Il test di gel diffusione ha mostrato l'attività inibitoria del PMEI, pozzetto 7. Il pozzetto 8 era vuoto. (b) Attività inibitoria del PMEI sulla PME di Prosecco.

Inibitori	Concentrazione	Estratto caricato	Proteina estratto	Vol. inibitore	Ø zona colorata	Unità enzimatiche
		(µl)	(µg)	(µl)	(mm)	(U)
1) Na ₂ EDTA	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
2) CaCl ₂	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
3) (NH ₄) ₂ SO ₄	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
4) saccarosio	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
5) (NH ₄)Cl	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
6) ac. galact.	0.1 M	5	2.3	5	12	0.16
7) PMEI	0.6 mg/ml	5	2.3	5 (3 µg)	0	0
8) vuoto	-	-	-	-	-	-
9) Estr. MOSC.	2.3 µg pr./5 µl	5	2.3	-	12	0.16

Tabella 3. Inibitori della PME e concentrazioni utilizzate in Figura 9 (a).

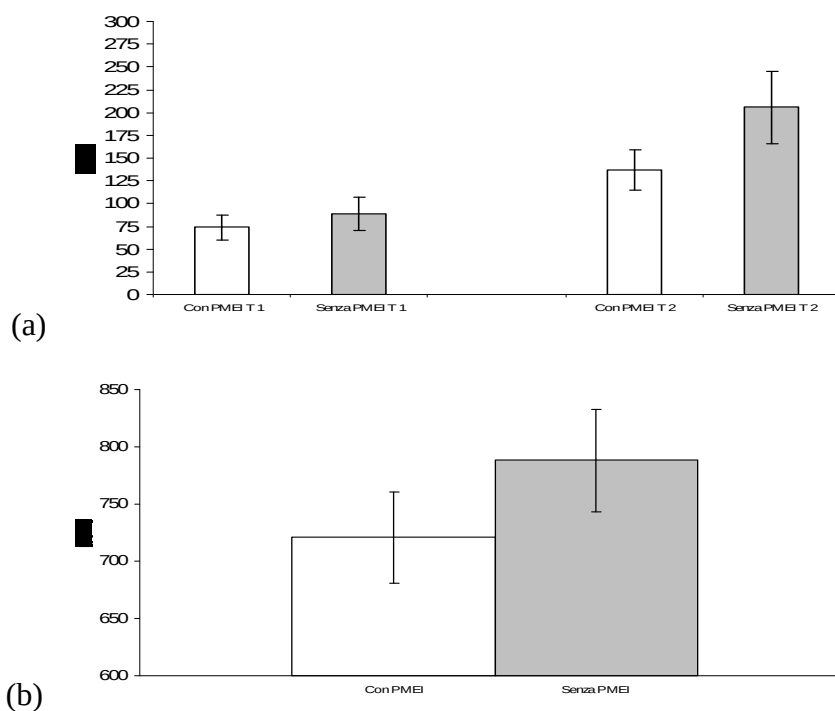


Figura 10. (a) Effetto inibitorio del PMEI sulla produzione di metanolo da vinacce di Moscato in due differenti tempi di incubazione (T 1 dopo 14 g; T 2 dopo 28 g) a 30°C. (b) Inibizione della produzione di metanolo in mosto d'uva Moscato dopo 7 g a 30°C.

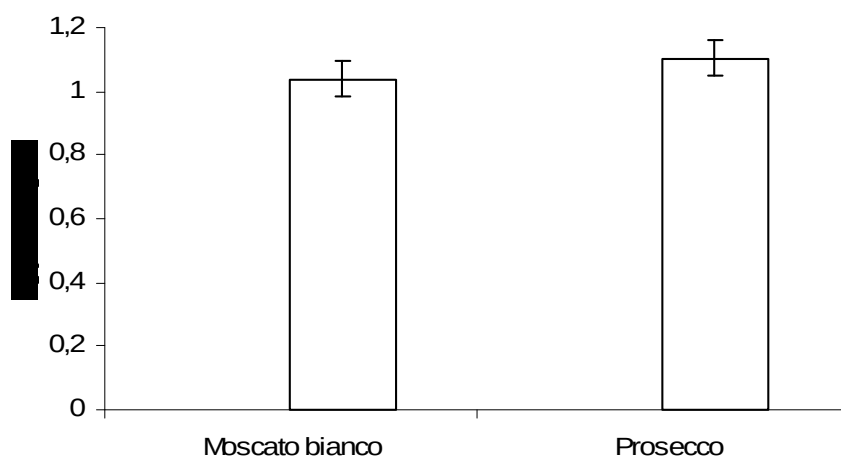
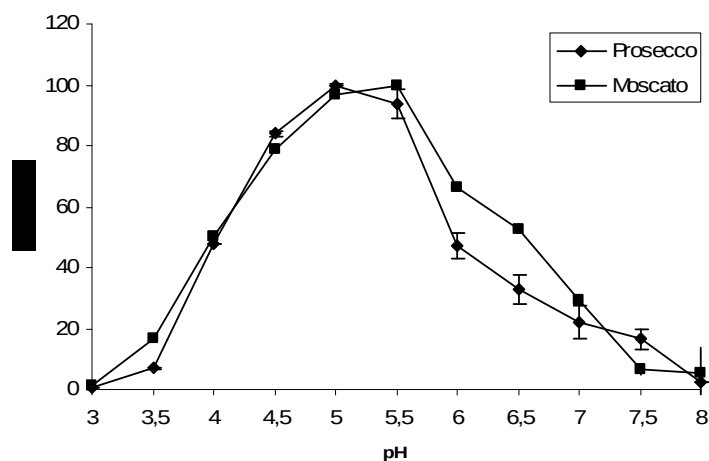


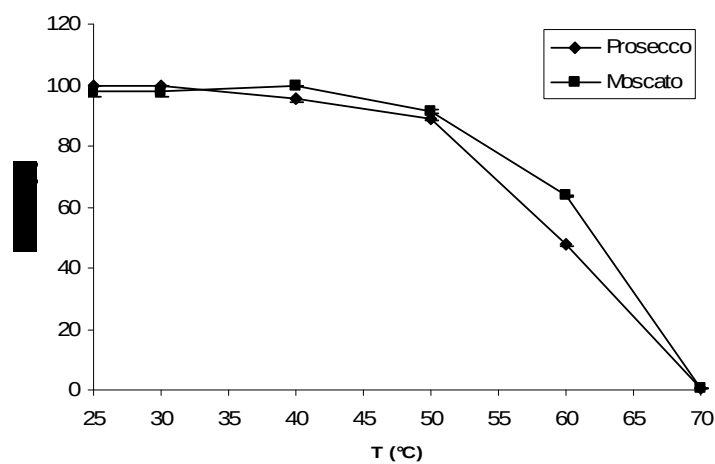
Figura 11. Resa di estrazione in mg proteina/g di uva Moscato bianco e Prosecco.

Substrato	Concentrazione (mM)	Attività specifica (AU/min/mg proteina)	λ (nm)
MOSCATO			
<i>o-Diidrossifenoli</i>			
Catecolo	10	5856.5 ± 6.22	400
<i>Monoidrossifenoli</i>			
<i>p</i> -Cresolo	10	12800 ± 2.54	400
PROSECCO			
<i>o-Diidrossifenoli</i>			
Catecolo	10	5868 ± 31.11	400
<i>Monoidrossifenoli</i>			
<i>p</i> -Cresolo	10	5800 ± 0.15	400

Tabella 4. Attività specifica della PPO in estratti di uva Moscato e Prosecco.

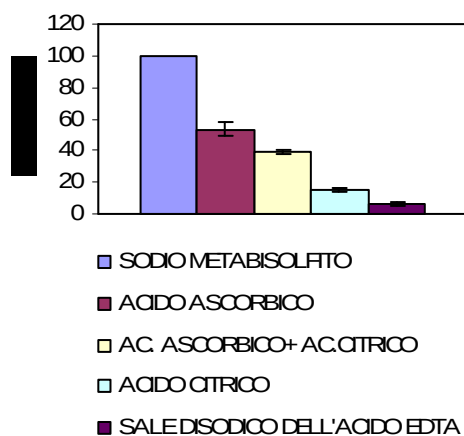


(a)

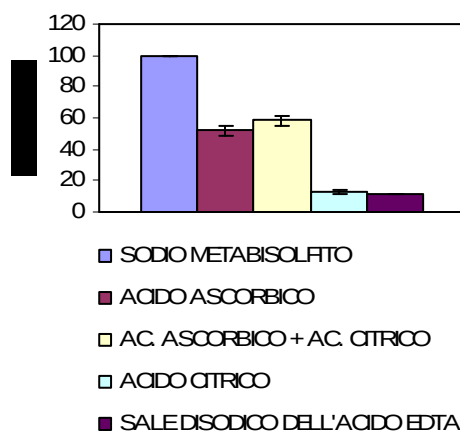


(b)

Figura 12. (a) Attività PPO degli estratti di uva Moscato e Prosecco in funzione del pH. (b) Stabilità termica della PPO degli estratti di uva Moscato e Prosecco.



(a)



(b)

Figura 13. % di inibizione dell'attività PPO di uve Moscato (a) e Prosecco (b) con inibitori con [5 mM].

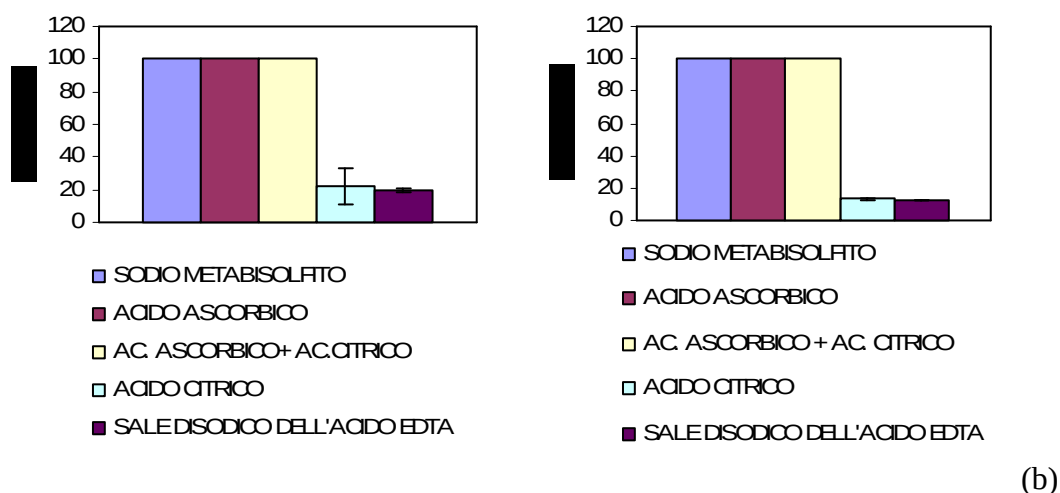


Figura 14. % di inibizione dell'attività PPO di uve Moscato (a) e Prosecco (b) con inibitori con [15 mM].

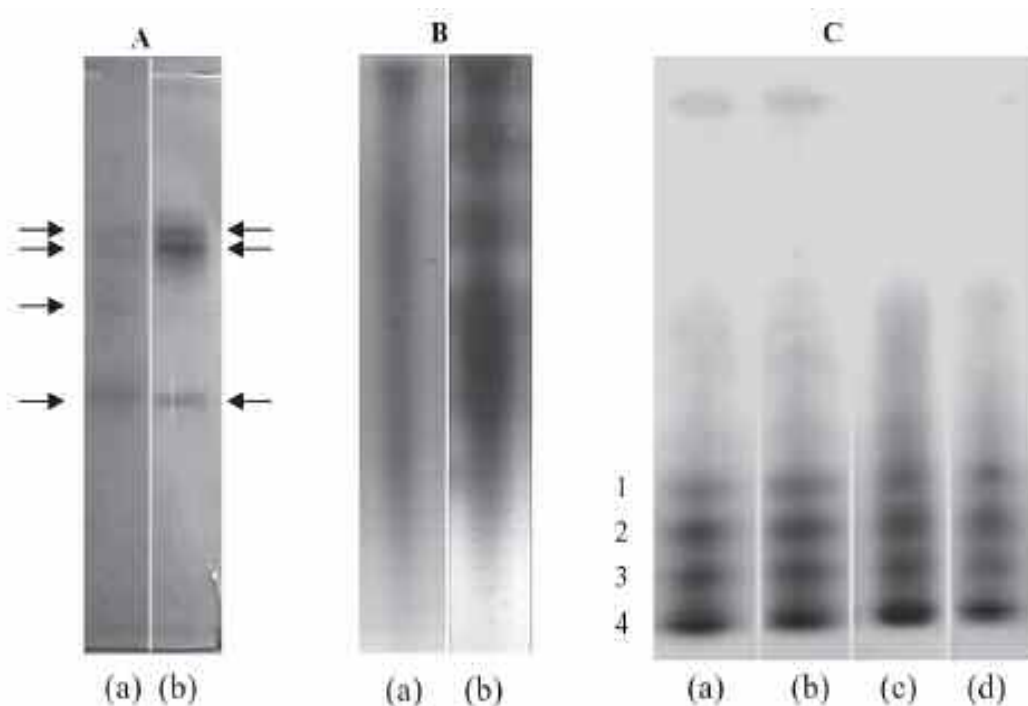


Figura 15. Zimogrammi dell'attività PPO degli estratti d'uva. Pannello A: SDS-PAGE 12% (10 µg proteina caricata per corsia), corsia (a) Moscato e corsia (b) Prosecco. Colorazione con L-DOPA/MBTH. Pannello B: Zimogrammi dell'attività PPO dell'uva Moscato (a) in N-PAGE 7.5% (10 µg proteina caricata per corsia) e con il Deriphat aggiunto solo nel tampone catodico (b). Colorazione con L-DOPA/MBTH. Pannello C: Zimogrammi dell'attività PPO (10 µg proteina caricata per corsia) degli estratti di uva Prosecco (a, b) e Moscato (c, d) in Deriphat-PAGE 10%. Colorazione rispettivamente con tBC/ADA e L-DOPA/MBTH.

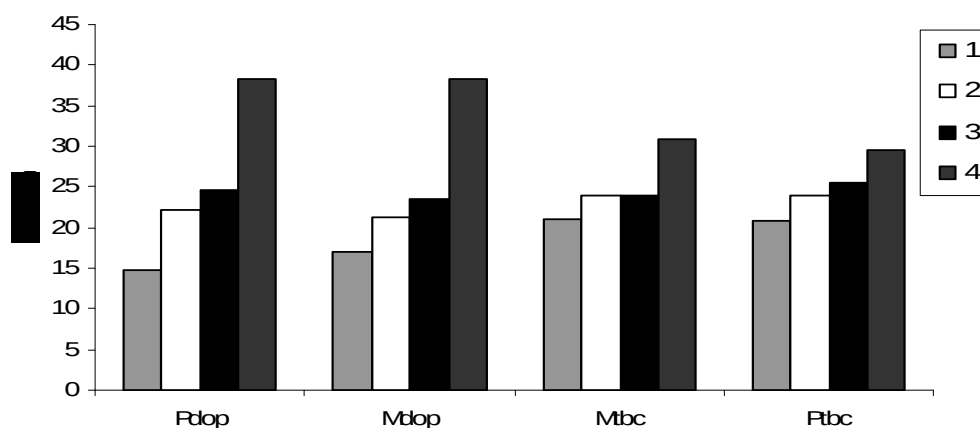


Figura 16. Analisi densitometrica degli zimogrammi in Deriphat (Figura 15, pannello C, corsie a, b, c, d) degli estratti di uva Prosecco (P) e Moscato (M), colorati con L-DOPA/MBTH (Pdop-Mdop) e con il *t*BC/ADA (Ptbc-Mtb). Le bande dello zimogramma sono state numerate dall'alto verso il basso. I valori riportati erano le medie di tre determinazioni. I coefficienti di variazione non eccedevano il 2%.

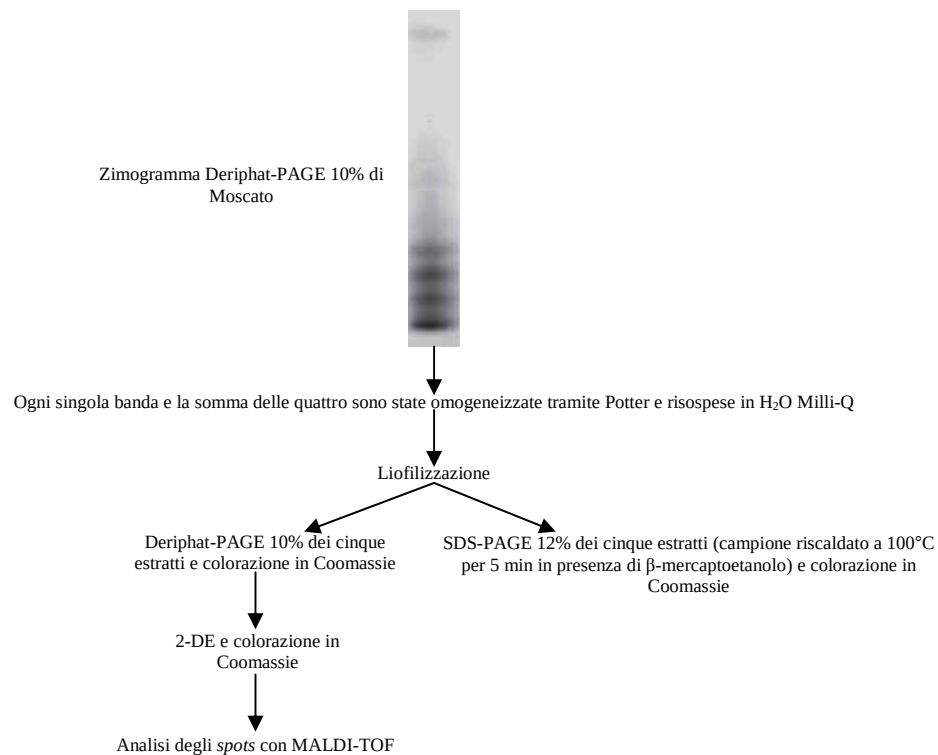


Figura 18. Separazione delle proteine delle bande zimografiche ottenute in Deriphat-PAGE.

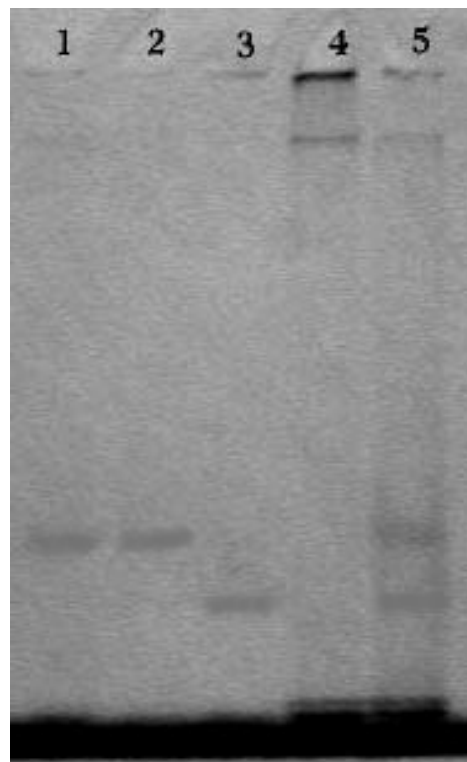


Figura 19. Deriphat-PAGE 10% delle bande zimografiche liofilizzate di Moscato. Le corsie 1,2,3,4 corrispondono alle quattro isoforme ri-separate in Deriphat-PAGE, la 5 è la frazione che le comprende tutte.

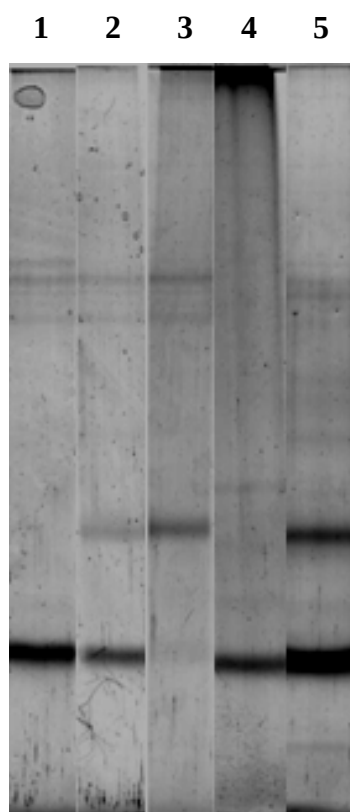


Figura 20. SDS-PAGE 12% delle bande zimografiche liofilizzate di Moscato. Le corsie 1,2,3,4 corrispondono alle quattro isoforme separate in SDS-PAGE, la 5 è la frazione che le comprende tutte.

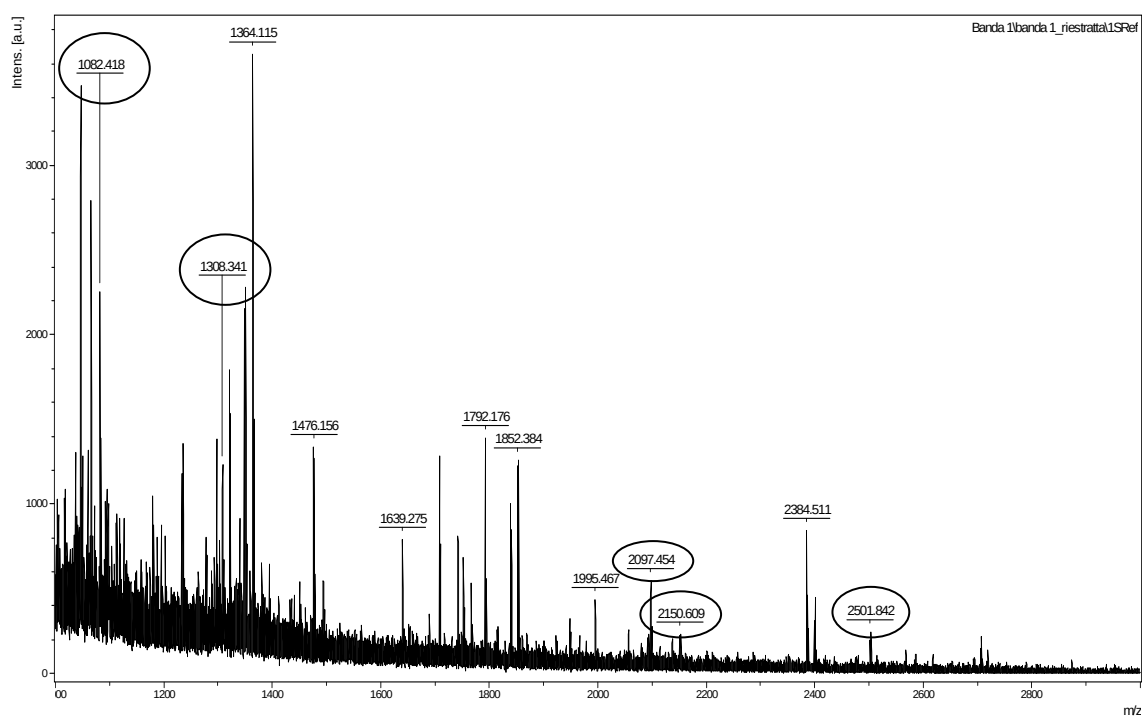
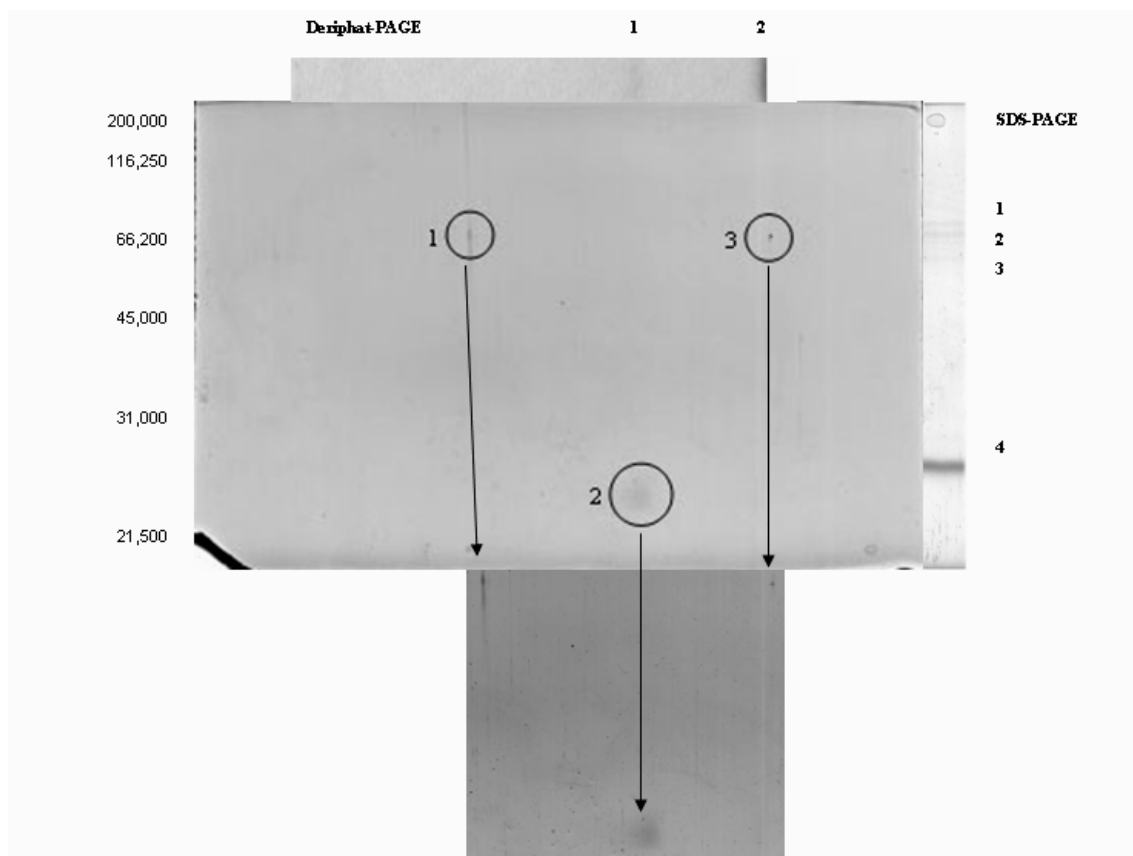


Figura 21. 2-DE della prima banda zimografica liofilizzata della Deriphat-PAGE di Moscato e spettro MALDI-TOF dello spot n. 1 (m/z 1000 ÷ 3000).

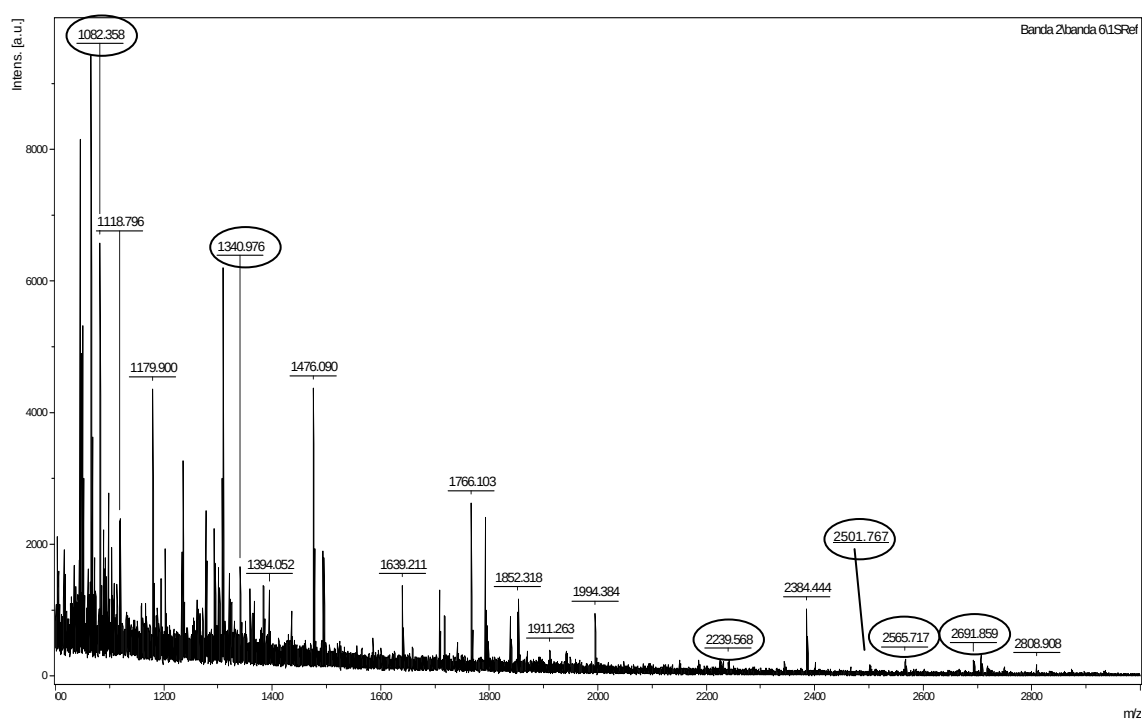
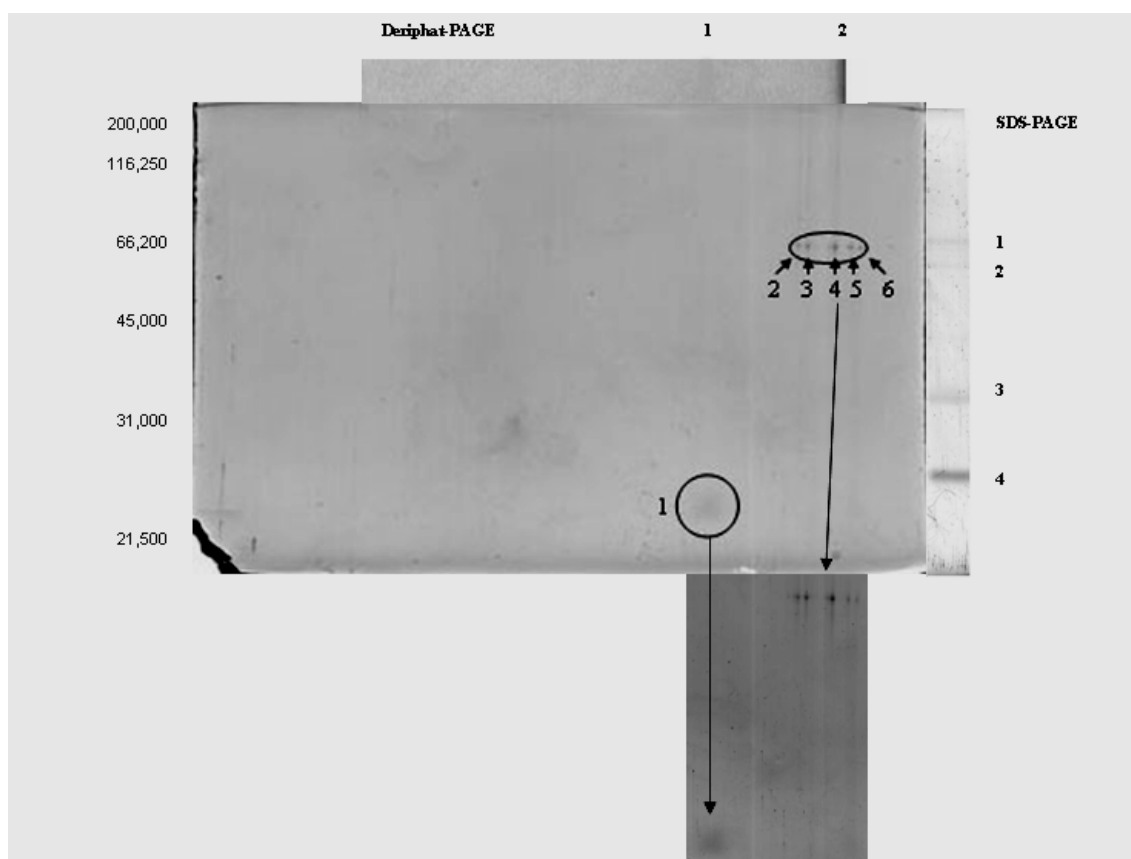


Figura 22. 2-DE della seconda banda zimografica liofilizzata della Deriphat-PAGE di Moscato e spettro MALDI-TOF dello spot n. 6 (m/z 1000 ÷ 3000).

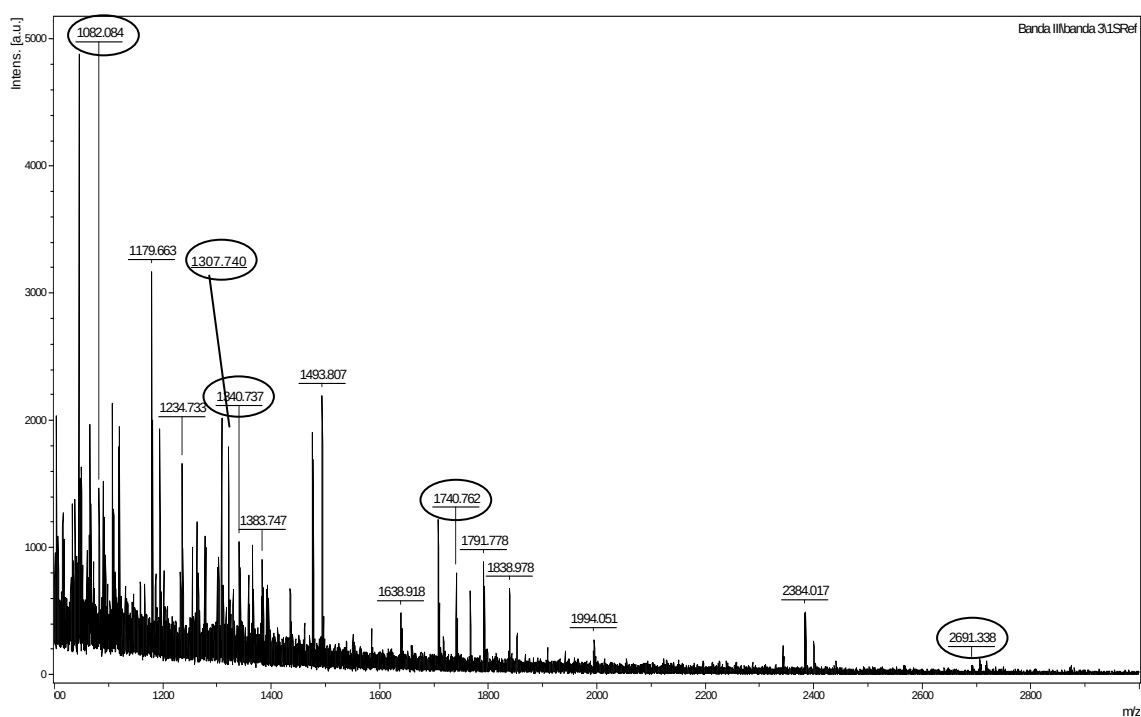
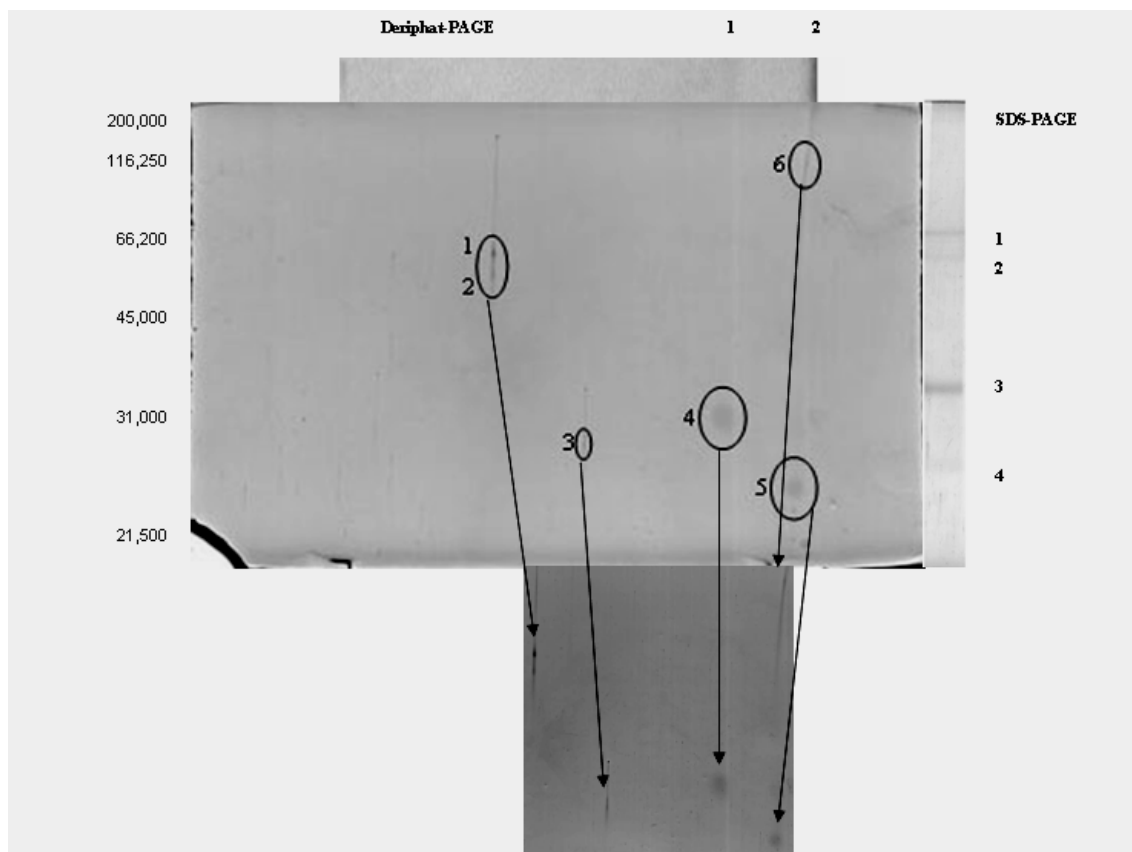


Figura 23. 2-DE della terza banda zimografica liofilizzata della Deriphat-PAGE di Moscato e spettro MALDI-TOF dello spot n. 3 (m/z 1000 ÷ 3000).

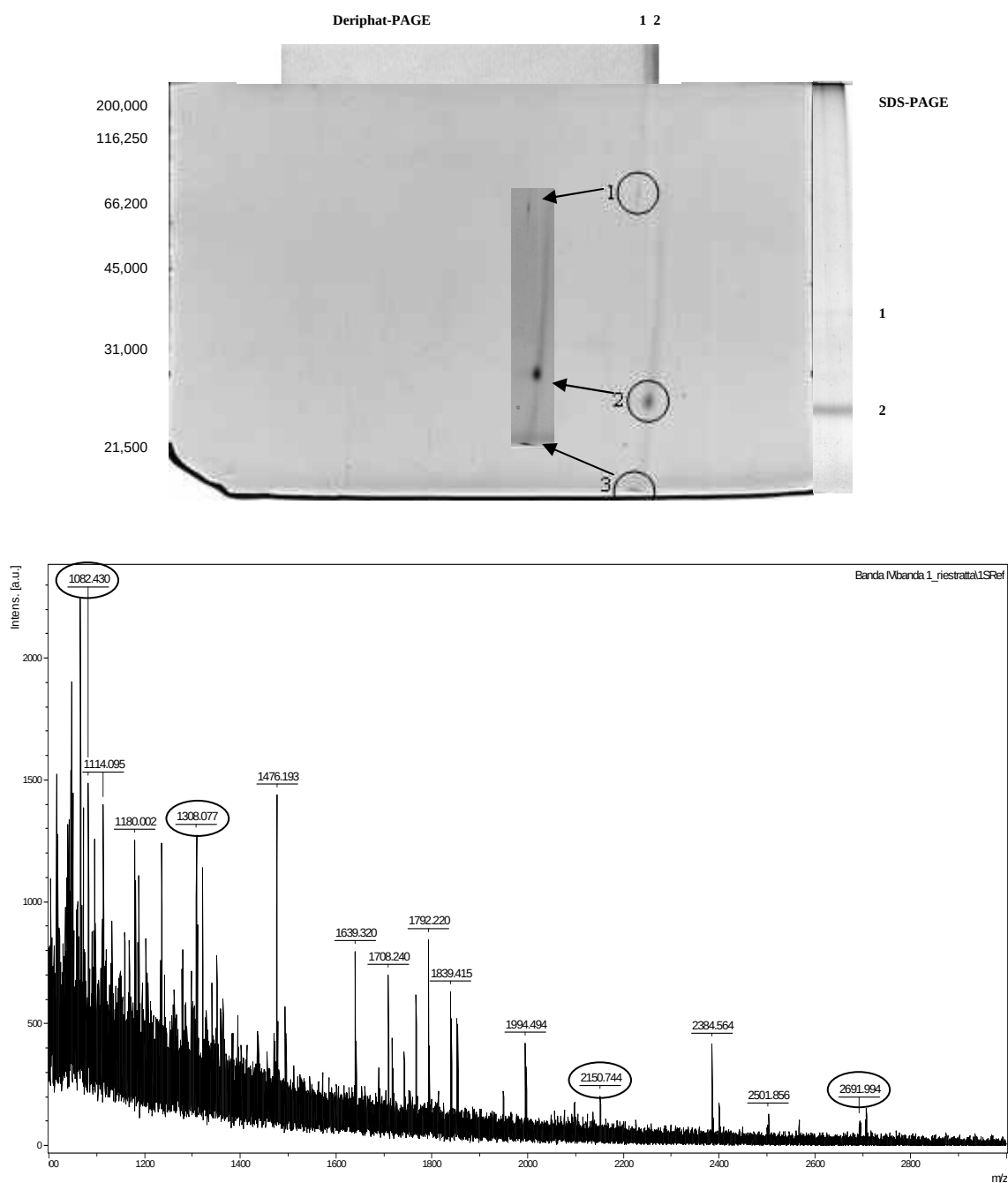


Figura 24. 2-DE della quarta banda zimografica liofilizzata della Deriphat-PAGE di Moscato e spettro MALDI-TOF dello spot n. 1 (m/z 1000 ÷ 3000).

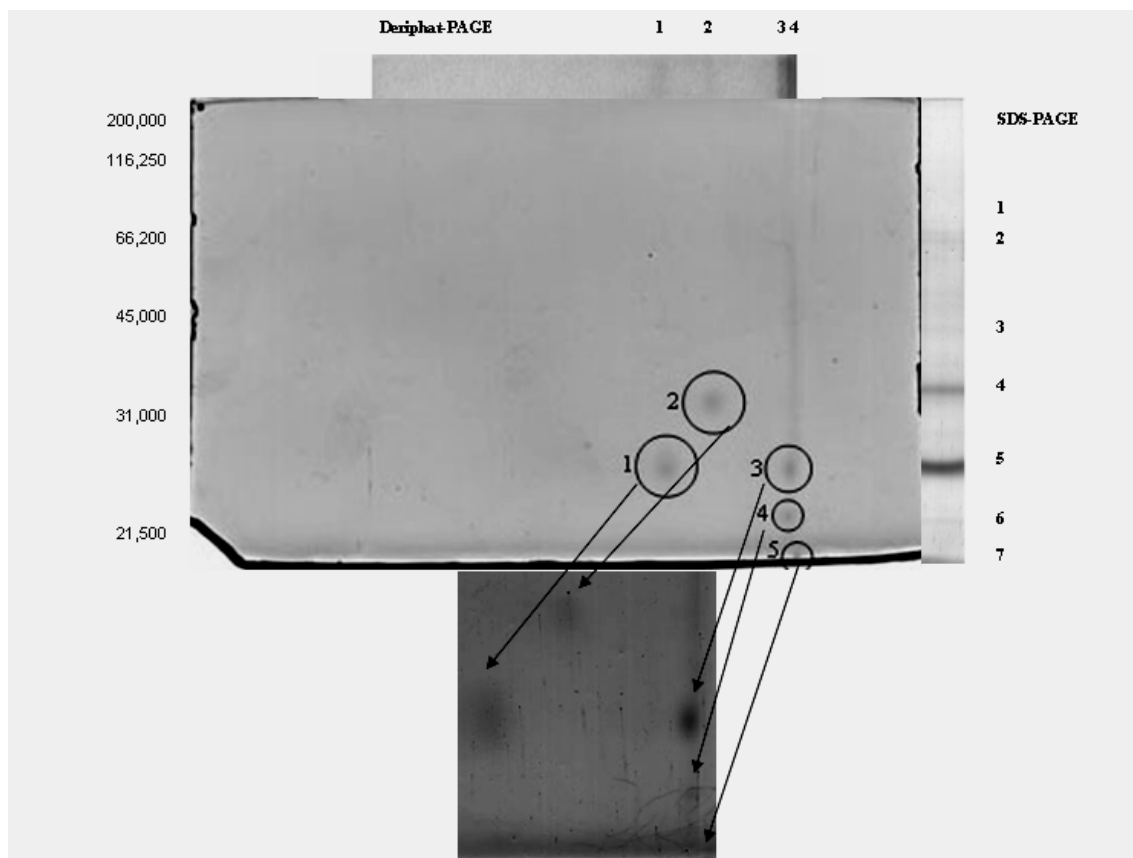


Figura 25. 2-DE delle quattro bande zimografiche liofilizzate della Deriphat-PAGE di Moscato.

	m/z 821	m/z 832	m/z 855	m/z 1071	m/z 1082	m/z 1308	m/z 1316	m/z 1340	m/z 1490	m/z 1554	m/z 1740	m/z 2097	m/z 2150	m/z 2239	m/z 2367	m/z 2463	m/z 2501	m/z 2565	m/z 2691	m/z 2780	m/z 2933	m/z 3053	m/z 5559
Banda I Spot 1		451- 457	444- 450		308- 317	502- 511						431- 446	167- 184				394- 413						185- 229
Banda I Spot 2			444- 450		308- 317					500- 511									44- 68				
Banda I Spot 3			444- 450		308- 317																		
Banda II Spot 1		451- 457	444- 450		308- 317			174- 184		500- 511	431- 443							394- 413					
Banda II Spot 2			444- 450		308- 317														44- 68				
Banda II Spot 3			444- 450	69- 77	308- 317		418- 428	174- 184			431- 443			429- 443	429- 446				44- 68				185- 229
Banda II Spot 4			444- 450		308- 317																		
Banda II Spot 5			444- 450					174- 184										394- 413					
Banda II Spot 6			444- 450		308- 317			174- 184						429- 443			394- 413	394- 413	44- 68				185- 229
Banda III Spot 1	559- 564		444- 450			502- 511			487- 498										44- 68	394- 413			185- 229
Banda III Spot 2						502- 511		174- 184	487- 498										44- 68				185- 229
Banda III Spot 3			444- 450		308- 317	502- 511		174- 184			431- 443								44- 68				
Banda III Spot 4			444- 450		308- 317											368- 386							
Banda III Spot 5			444- 450		308- 317	502- 511		174- 184			431- 443						394- 413						
Banda III Spot 6	559- 564		444- 450		308- 317	502- 511		174- 184											44- 68		42- 68		185- 229
Banda IV Spot 1			444- 450		308- 317	502- 511							167- 184						44- 68			395- 419	185- 229
Banda IV Spot 2			444- 450									431- 446	167- 184						44- 68				185- 229
Banda IV Spot 3			444- 450	69- 77	308- 317							431- 446	167- 184				394- 413		44- 68				185- 229
Σ Banda I			444- 450							500- 511									44- 68				185- 229
Σ Banda II						502- 511										368- 386							185- 229
Σ Banda III																							185- 229
Σ Banda IV			444- 450	69- 77	308- 317	502- 511						431- 446					394- 413		44- 68				185- 229
Σ Bande I ÷ IV			444- 450	69- 77		502- 511													44- 68				128- 229

Tabella 5. Fosforilazioni degli ioni inferiori a m/z pari a 1000 non riportate negli spettri delle figure 21, 22, 23, 24.

7. BIBLIOGRAFIA

Antonelli A.; Galli, M., (1995), Determination of volatiles in spirits using combined stationary phases in capillary GC, *Chromatographia*, **41**: 722-725.

Armstrong D. W.; Martin S. M., Yamazaki H., (1984), Production of ethyl acetate from dilute ethanol solutions by *Candida utilis*, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**: 1038-1041.

Aydemir T., (2004), Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, *Food Chem.*, **87**: 59-67.

Balestrieri C., Castaldo D., Giovane A., Quagliuolo L., Servillo L. A., (1990), Glycoprotein inhibitor of pectinmethylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*), *Eur. J. Biochem.*, **193**: 183-187.

Balestrieri C., Servillo L., Quagliuolo L., Giovane A., Castaldo D., (1993), Proteic inhibitor of pectinesterase and use thereof in the preparation of fruit and vegetable juices, US. Patent n° 5053232.

Barbagallo R. N.; Spagna G.; Palmeri R.; Restuccia C.; Giudici P., (2004), Selection, characterization and comparison of β -glucosidase from mould and yeasts employable for enological applications, *Enzyme Microb. Tech.*, **35**: 58-66.

Bardi L.; Dell'Oro V.; Delfini C.; Marzona M., (1993), A rapid spectrophotometric method to determine esterase activity of yeast cells in aqueous medium, *J. Inst Brew.* **99**: 385-388.

Barnavon L.; Doco T.; Terrier N.; Ageorges A.; Romieu C.; Pellerin P., (2001), Involvement of pectin methyl-esterase during the ripening of grape berries: partial cDNA isolation, transcript expression and changes in the degree of methylesterification of cell wall pectins, *Phytochemistry*, **58(5)**: 693–701.

Bauernfeind J. C. & Pinkert, D. M., (1970), Food processing with added ascorbic acid, *Adv. Food Res.*, **18**: 219-315.

Beélik A., (1956), Kojic acid, *Adv. Carbohy. Chem.*, **11**: 145-183.

Bellincampi D., Cervone F., De Lorenzo G., Raiola A., Camardella L., Giovane A., Balestrieri C., Servillo L., Quagliolo L., (2003), Inibitore della pectina metilesterasi nella preparazione dei succhi di frutta e derivati, It. Patent n° RM2003A000346.

Beranova-Giorgianni S., (2003), Protome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations, *Trends Anal. Chem.*, **22**: 273–281.

Bolognani L., (1974), Trasformazioni energetiche negli organismi viventi. *Quaderni di biologia*, Piccin (Ed.), Padova.

Bordenave M., (1996), Analysis of pectinmethylesterase. *Plant Cell Wall Analysis* (Modern Methods of Plant Analysis), Linskens H. F. e Jackson J. F. (Eds), **17**: 165-180.

Bornscheuer U. T. (2002) Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis, *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**: 73-81.

Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E., (1995), *Wines and practices of winemaking*, Chapman Hall (Ed.), New York.

Bovo B., (2005), Valutazioni microbiologiche sull'impiego di lieviti selezionati per la produzione della grappa, *Tesi di laurea*, Università di Padova.

Bradford M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, **72**: 248-254.

Brillouet J. M., (1987), A study of pectic polysaccharides in musts from various mature grapes grown in the Pech Rouge experimental vineyards, *Biochimie*, **69 (6-7)**: 713-721.

Buchi W. & Deuel H., (1954), *Helv. Chemica Acta*, **37**: 1392.

Cai Y., Gaffney S. H., Lilley T. H., Magnolato D., Martin R., Spencer C. M., Hasmal E. (1990), Polyphenoloxidase interaction. Part 4. Model studies with caffeine and cyclodextrins, *J. Chem. Soc., Perkin trans*, **2**: 2197-2209.

Carnicini A. & Del Pozzo A., (1986), Sui componenti volatili dei mosti e dei vini in relazione alle tecnologie di ottenimento, *Vignevini*, **12**: 17-27.

Carnicini A., Antonelle A., De Giacomi F., Riponi C., Motta M., (1993), La composizione aromatica dei distillati di vino in funzione dei ceppi di lievito e del grado di maturazione delle uve, *Industrie delle Bevande*, **XXII**: 193-201.

Charnay D., Nari J., Noat G., (1992) Regulation of plant cell-wall pectinmethylesterase by polyamines – Interactions with the effects of metal ions, *J. Biochem.*, **205**: 711-714.

Cheftel J. C. (1992), Effects of high hydrostatic pressure on food constituents: overview, C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans & P. Masson, Ed. High Pressure and Biotechnology, London, John Libbey Eurotext, 195-209.

Chinnici F.; Natali N.; Antonelli A.; Riponi C. (2001) Influence of yeast strain on the aromatic characteristics of grappa from Trebbiano marcs, *Industrie delle Bevande*, **XXX**: 475-479.

Claus H., Decker H., (2006) Bacterial tyrosinases, *Syst. Appl. Microbiol.*, **29**, 3-14.

Cordonnier R., Günata Z., Baumes R. L., Bayonove C., (1989), Recherche d'un matériel enzymatique adapté à l'hydrolises des précurseurs d'arôme de nature glycosidique du raisin, *Conn. Vigne Vin.*, **23**: 7-23.

Cortés S.; Gil M. L.; Fernández E. (2005) Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits, *Food Control*, **16**: 383-388.

Coulter T. P., (2002). Melanine, La chimica degli alimenti, Ed. Zanichelli, Bologna, 174-176.

Davis B. J., (1964), Disc Electrophoresis. 2, Method and application to human serum proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**: 404-427.

D. L. 155/97 Attuazione delle direttive 93/43/CEE e 96/3/CE concernenti l'igiene dei prodotti alimentari, *Gazzetta Ufficiale*, **1997**, 136.

D'Incecco N.; Bartowsky E.; Kassara S.; Lante A.; Spettoli P.; Henshke P. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation, *Food Microbiol.*, **21**: 257-265.

Dell'Oro V., Bardi L., Delfini C., (1992), Esterasi nei lieviti e nei vini, *Vini d'Italia*, **3**: 49-54.

Da Porto C. (1998) Grappa and grape spirit production, *Cri. Rev. Biotech.*, **18**: 13-24.

Da Porto C., (2002), Volatile composition of "grappa low wines" using different methods and conditions of storage on an industrial scale, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **37**: 395-402.

De Pina C. G.; Hogg T. A. (1999) Microbial and chemical changes during the spontaneous ensilage of grape pomaces, *J. Applied Microbiol.*, **86**: 777-784.

De Rosa T., Castagner R., (1994), *Tecnologia delle grappe e dei distillati d'uva*, Edagricole (Ed.), Bologna, 9, 40.

Delcroix A., Günata Z., Sapis J-C., Salmon J-M., Bayonove C., (1994), Glicosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect of terpenol content of muscat wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, **45 (3)**: 291-296.

Diéguez S. C.; De La Peña Ma. L. G.; Gómez E. F. (2003) Approaches to spirit aroma : contribution of some aromatic compounds to the primary aroma in samples of *Orujo* spirits, *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 7385-7390.

Diéguez S. C.; De La Peña M. L. G.; Esperanza F. G. (2005) Volatile composition and sensory characters of commercial Galician *Orujo* spirits, *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 6759-6765.

Downie B., Dirk L. M. A., Hadfield K. A., Wilkins T. A., Bennet A. B., Bradford K. J., (1998), A gel diffusion assay for quantification of pectinmetylesterase activity, *Anal. Biochem.*, **264**: 149-157.

Doubourdieu D., (1982), Recherches sur les polysaccharides secretes par *Botrytis cinerea* dans la baie de raisin. These Doctorat d'Etat es Sciences, Université de Bordeaux, II.

Dry I. B., Robinson S. P., (1994), Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase, *Plant Mol. Biol.*, **26**: 495–502.

Dziezak J. D. (1986), Preservatives: Antioxidants - The ultimate answer to oxidation, *Food Technol.*, **40(9)**: 94-102.

EEC Council regulations 1576/89 on the definition, description and presentation of spirit drinks, *Official Journal of European Community*, **1989**, L160, 1-17.

Fan M. H., Wang M., Zou P. (2005) Effect of sodium chloride on the activity and stability of polyphenol oxidase from Fuji apple. *J. Food Biochem.*, **29** : 221-230.

Fayyaz A., Asbi B. A., Ghazali H. M., Che Man Y. B., Jinap S., (1995) Kinetics of papaya pectinesterase, *Food Chem.*, **53**: 129-135.

Fennema O. R. (1975), Activity of enzymes in partially frozen aqueous systems, R. B. Duckworth, Ed. *Water Relations of Foods*, New York, Academic Press, 397-413.

Ferrer O. J., Otwell W. S., Marshall M. R. (1989) Effect of bisulfite on lobster shell phenoloxidase, *J. Food Sci.*, **54**: 478-480.

Filisetti-Cozzi T. M. C. C.; Carpita N. C. (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars, *Anal. Biochem.*, **197**: 157-162.

Finkle B. J., Nelson R. F. (1963), Enzyme reactions with phenolic compounds: effect of o-methyl-transferase on a natural substrate of fruit polyphenoloxidase, *Nature*, **197**: 902-903.

Flanzy C. (1998) Les polyphénoloxidasés du raisin et du vin, *Oenologie*, Ed. Technique & Documentation, Paris, 364-368.

Fleet G. H. e Heard G. M., (1993), Yeast growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet G. H. (Ed), Harwood Academic: 27-54.

Fleet G. H., (1998), The microbiology of alcoholic beverage. *Microbiology in fermented foods*, Wood BJB (Ed.), Blakie Accademic and Professional, Glasgow. **Vol. 1**: 217-262.

Fugelsang K. C., (1997), *Wine Microbiology*, Chapman and Hall (Ed.), New York.

Fujii T., Nagasawa N., Iwamatsu A., Bogaki T., Tamai Y., Hamachi M., (1994), Molecular cloning sequence analysis, and expression on the yeast alcool acetyltransferase gene, *Appl. Envirom. Microbiol.*, **48**: 2786-2792.

GAZZETTA UFFICIALE della Repubblica Italiana n. 351 del 22 dicembre 1984.

GAZZETTA UFFICIALE della Repubblica Italiana n. 213 del 12 settembre 1997
Decreto del Presidente della Repubblica n. 297 del 16 luglio 1997.

GAZZETTA UFFICIALE n. 293 del 16 dicembre 1998 della Repubblica Italiana
riportante la circolare n. 163 del 20 novembre 1998 del Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato.

Goi G., Odello L., (1981), *La grappa ed il suo mondo tra passato e presente*, Del Laboratorio (Ed.), Brescia.

Gerogiannaki M.; Komaitis M. E.; Stavarakas D. E.; Polysiou M.; Athanasopoulos P. E.; Spanos M. (2007) Evaluation of acetaldehyde and methanol in greek traditional alcoholic beverages from varietal fermented grape pomaces (*Vitis vinifera* L.), *Food Control*, **18** : 988-995.

Gerogiannaki-Cristopolulou M.; Kyriakidis N.; Athanasopoulos P. E. (2004) Effect of grape variety (*Vitis vinifera* L.) and grape pomace fermentation conditions on some volatile compounds of the produced grape pomace distillates, *Int. J. Food Sci. Technol.*, **38** : 225-20.

Giovane A., Balestrieri C., Quagliuolo L., Castaldo D., Servillo L., (1995) A glycoprotein inhibitor of pectinmethylesterase in kiwi fruit. Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor, *Eur. J. Biochem.*, **233**: 926-929.

Goodwin C. O., Morris, J. R. (1991), Effect of ultrafiltration on wine quality and browning, *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**: 347-353.

Gregory R. P. F., Borbély G., Demeter S., Faludi-Dániel, Á., (1982), Chiroptical properties of chlorophyll-protein complexes separated on Deriphat/polyacrylamide gel, *Biochem. J.*, **202**: 25–29.

Gueguen Y.; Chemardin P.; Janbon G.; Arnaud A.; Galzy P. (1996), A very efficient β -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices, *J. Agr. Food Chem.*, **44**: 2336–40.

Günata Z. Y. ; Bayonove C. L. , Baumes R.L., Cordonnier R. L. (1985), The aroma of grapes. Localisation and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components cv. Muscat during first development and msaturation, *J. Sci. Food Agric.*, **36**: 857-862.

- Günata Z. Y. ; Bitteur S. ; Brillouet J. M. ; Bayonove C. L. ; Cordonnier R. L. (1988), Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. *Carbohydr. Res.*, **134**: 139–49.
- Guyer R. B., Miller W. B., Bissett O. W., Velduis M. K., (1956), Stability of frozen concentrated orange juice, *Food Technol.*, **10**: 570-574.
- Hagerman A. E.; Austin P. J. (1986), Continuous spectrophotometric assay for plant pectin methyl esterase, *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 440–444.
- Haleem J. I., (2001), The role of separation science in proteomics research, *Electrophoresis*, **22**: 3629-3638.
- Huisman M. M. H., Oosterveld A., Schols H. A., (2004), Fast determination of the degree of methyl esterification of pectins by head-space GC, *Food Hydrocolloids*, **18**: 665-668.
- Jackson R. S., (2002), Wine Tasting, Academic Press (Ed.), London, 64.
- Janovitz-Klapp A. H., Richard F. C., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1990), Inhibition studies on apple polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 926-931.
- Kahn V., (1976) Polyphenol oxidase isoenzyme in avocado, *Phytochem.*, **15**: 267-272.
- Kawano Y. C.; Dos Santos Cunha Chellegatti M. A.; Said S.; Vieira Fonseca M. J. (1999), Comparative study of intracellular and extracellular pectinases produced by *Penicillium frequentans*, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29**: 133–140.
- Kertesz Z. I., (1938), Pectic Enzymes of tomatoes, *Food Research*, **3**: 481-487.
- Kidron M., Harel E., Mayer A. M. (1978), Catechol oxidase activity in grapes and wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, **29**: 30-35.

Klavons J. A.; Bennett R. D. (1986), Determination of methanol using alcohol oxidase and its application to methyl ester content of pectins, *J. Agric. Food Chem.*, **34**: 597-599.

Kokkinofta R.; Petrakis P. V.; Mavromoustakos T.; Theocharis C. R. (2003), Authenticity of the traditional cypriot spirit “Zivania” on the basis of metal content using a combination of coupled plasma spectroscopy and statistical analysis, *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6233-6239.

Körner B., Zimmermann G., Berk Z., (1980) Orange pectinesterase: purification, properties, and effect on cloud stability, *J. Food Sc.*, **45** (5): 1203-1206.

L. 7 dicembre 1951, n. 1559. Disciplina della produzione e del commercio delle acquaviti, (pubbl. in *Gazz. Uff.* n. 12 del 15 gennaio 1952).

Labuza T. P., Lillemo J. H., Taoukis P. S. (1992), Inhibition of polyphenoloxidases by proteolytic enzymes, *Flüssiges Obst.*, **59**: 15-20.

Laemmli U. K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 680–685.

Lambrechts M. G., Pretorius I. S. (2000), Yeast and its importance to wine aroma, *South African J. Enol. Vitic.*, **21**: 97-129.

Lante A., Zocca F., Spettoli P., Lomolino G., Bellicampi D., Raiola A., Lionetti V., (2007) Uso di un inibitore proteico della pectinmetilesterasi per la riduzione della formazione di metanolo in mosti di uva e vinacce e processo per la stessa, It. Patent n° PD2007A000065.

Lecas M. e Brillouet J. M., (1994), Cell wall composition of grape berry skins, *Phytochemistry*, **35**: 1241-1243.

Lee C. Y., Robinson W. B., Van Buren J. P., Acree T. E., Stoewsand G. S., (1975), Methanol in wines in relation to processing and variety, *Am. J. Enol. Vitic.*, **26**: 184-187.

Leaute R., (1990), Distillation in alambic, *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 90-103.

Lee C. Y., Smith N. L., Nelson R. R., (1979), Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in Concord grape juice and wine, *Food Chem.*, **4**: 143-148.

Lionetti V., Raiola A., Camardella L., Giovane A., Obel N., Pauly M., Favaron F., Cervone F., Bellincampi D. (2007), Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*, *Plant Physiology*, **143**: 1871-1880.

Lomolino G.; Rizzi C.; Spettoli P.; Curioni A.; Lante A. (2003), Cell vitality and esterase activity of *Saccharomyces cerevisiae* is affected by increasing calcium concentration, *Agro Food Industry Hi-Tech*, 32–35.

Lomolino G.; Zocca F.; Spettoli P.; Lante A. (2006), Detection of β -glucosidase and esterase activities in wild yeast in a distillery environment., *J. Inst. Brew.*, **112(2)**: 97-100.

Luh, B. S., Phithakpol, B., (1972) Characteristic of polyphenol oxidase related to browning in cling peaches, *J. Food Sci.*, **27**: 264-268.

Ly-Nguyen, B., Van Loey A. M., Smout C., Verlent I., Duvetter T., Hendrickx M. E., (2004), effect of intrinsic and extrinsic factors on the interaction of plant pectin methylestarase and its proteinaceous inhibitor from kiwi fruit, *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 8144-8150.

Madero C. F., Finne, G. (1982), Properties of phenoloxidase isolated from gulf shrimp, Proceedings of the Seventh Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas, New Orleans, LA, 328-339.

Marais J., Pool H. J., (1980), Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines, *Vitis*, **19**: 151-164.

Marais J., (1990), Wine aroma composition, *Food Rev.*, **17**: 18-21.

Markovic O., Kohn R., (1984), Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase, *Experientia*, **40**: 842-843.

Markwell J. P., Thornber J. P., Boggs R. T., (1979) Higher chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76** (3): 1233-1235.

Marshall M. R., Jeongmok K., Cheng-I Wei., (2000) Enzymatic Browning in Fruits, Vegetables and Seafoods, *FAO*, 1-56.

Martinez M.V., Whitaker, J.R. (1995), The biochemistry and control of enzymatic browning, *Food Sci. & Technol.*, **6**: 195-200.

Martini A., (1993), The origin and domestication of wine yeast *Saccharomyces Cerevisiae.*, *J. Wine Res.*, **4**: 165-176.

Mateo J. J.; Jiménez M. (2000), Monoterpenes in grape juice and wines., *J. Chrom. A*, **881**: 557-567.

Mayer A. M., Harel, E. (1978) Polyphenol oxidase in plants. *Phytochemistry*, **18**, 193-215.

Mayer A. M., (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places ? A review, *Phytochemistry*, **67**: 2318-2331.

Mayer A. M., Harel E., (1991), *Food enzymology. Phenoloxidases and their Significance in Fruit and Vegetables*, Vol. 1, Fox, P. F., (Eds.), The Universities Press, Belfast, 373–398.

McEvily A. J., Iyengar R., Otwell W. S. (1992), Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**: 253-273.

Meloni G., (1953-1958), *L'industria dell'alcol*, Vol. I, II, III; Hoepli (Ed.), Milano.

Micheli F. (2001), Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology., *Trends Plant Sci.*, **6**: 414-419.

Morton I. D. & McLeod A. J. (1986). Food Flavours (Parts A and B), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Moore B. M., Flurkey W. H., (1990) Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase, *J. Biol. Chem.*, **265 (9)**, 4982-4988.

Nicolas J. J., Richard-Forget F. C., Goupy P. M., Amiot M. J. & Aubert S. (1994) Enzymatic browning reactions in apple and apple products, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **34**, 109-157.

Núñez-Delicado E., Serrano-Megías M., Pérez-López A. J., López-Nicolás J. M., (2005) Polyphenol oxidase from Dominga table grape, *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 6087-6093.

Núñez-Delicado E., Serrano-Megías M., Pérez-López A. J., López-Nicolás J. M., (2007), Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape, *Food Chem.*, **100**: 108–114.

Odello L., (1988), *Come fare e apprezzare la grappa*, Demetra (Ed.), Sommacampagna (VR).

Odello L., Giomo A., Versini G., Zironi R., (1997), *Grappa analisi sensoriale & Tecnologie*, Centro studi e formazione assaggiatori (Ed.), Brescia.

Okada Y., Kubota Y., Koizumi K., Hizukuri S., Ohfuji T., Ogata K. (1988), Some properties and the inclusion behavior of branched cyclodextrins, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**: 2176-2185.

Parish M. E. (1998) Orange juice quality after treatment by thermal pasteurization or isostatic high pressure, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **31**: 439-442.

Palmeri R., Spagna G. (2007), β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application, *Enzyme Microb. Technol.*, **40**: 382-389.

Peddie H. A. B., (1990), Ester formation in brewery fermentation, *J. Inst. Brew.*, **96**: 327-331.

Peynaud E., (1952), *Ann. Fals. Fraudes*, **45**: 11.

Pilnik W. & Voragen A. G. J., (1991), The Significance of Endogenous and Exogenous Pectic Enzymes in Fruit and Vegetable Processing, *Food Enzymology*, Vol. 1: 303-309; Elsevier Applied Science.

Pretorius I. S. (2000), Tailoring wine yeast for the new millenium : “novel approaches to the ancient art of winemaking”, *Yeast*, **16**: 708-709.

Rapeanu G., Van Loey A., Smout C., Hendrickx M., (2006), Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*), *Food. Chem.*, **94**: 253-261.

Ren C., Kermode A. R., (2000), An increase in pectin methylesterase activity accompanies dormancy breakage and germination of yellow cedar seeds, *Plant Physiol.*, **124**: 231-242.

Rescigno A., Sollai F., Rinaldi A. C., Soddu G., Sanjust, E., (1997), Polyphenol oxidase activity staining in polyacrilamide electrophoresis gels, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **34**: 155-159.

Ribéreau-Gayon P.; Glories Y.; Maujean A.; Doubourdieu D. (2000), *Handbook of enology*. Vol. 2, John Wiley & Sons LTD (Eds.), Chichester (England), 51, 187-216, 319.

Richard-Forget F. M., Goupy P. M., Nicolas J. J. (1992), Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning, II, Kinetic studies, *J. Agric. Food Chem.* **40**: 2108- 2113.

Richardson T. & Hyslop D. B. (1985), Enzymes, O. R. Fennema, Ed. Food Chem., New York, Marcel Dekker, 371-476.

Rizzi C., Lomolino G., Lante A., Crapisi A., Spettoli P., Curioni A., (2003), Solubilization and activity detection in polyacrylamide gels of a membrane-bound esterase from an oenological strain of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Inst. Brew.*, **109 (3)**: 187-193.

Rombouts F. M., Pilnik W., (1980) Economic microbiology, London: Academic Press, Vol. 5, 227-282.

Sánchez-Ferrer A., Bru R., Cabanes J., Garcia-Carmona F., (1988) Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase, *Phytochem.*, **(27) 2**: 319-321.

Santini C., Tidu V., Tognon G., Ghiretti-Magaldi A., Bassi R., (1994), Three-dimensional structure of the higher-plant photosystem II reaction centre and evidence for its dimeric organization in vivo, *Eur. J. Biochem.*, **221 (1)**: 307–315.

Saunier B.; Kilker R. D. Jr., Tkacz J. S.; Quaroni A., Herscovics A., (1982), Inhibition of N-linked complex oligosaccharide formation by 1-deoxynojirimycin, an inhibitor of processing glucosidases, *J. Biol. Chem.*, **257 (23)**: 14155-14161.

Segel I. H. (1976), Biochem. calculations, 273-277. New York, John Wiley and Sons.

Shägger H.; Von Jagow G. (1987), Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.*, **166 (2)**: 368–379.

Sharma R. R., Goswami A. M., Singh C. N., Chhonkar O. P., Singh G. (2001) Catecholase and cresolase activities and phenolic content in mango (*Mangifera indica* L.) at panicle initiation, *Sci. Hort.*, **87**: 147-151.

Shimazaki Y., Sugawara Y., Manabe T., (2004) Nondenaturing two-dimensional electrophoresis enzyme profile involving activity and sequence structure of cytosol proteins from mouse liver, *Proteomics*, **4** (5): 1406-1411.

Silva M. L.; Malcata F. X. (1998), Relationships between storage conditions of grape pomace and volatile composition of Spirits obtained therefrom, *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**: 56-64.

Silva M. L.; Malcata F. X. (1999), Effects of time of grape pomace fermentation and distillation cuts on the chemical composition of grape marcs, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **208**: 134-143.

Sims C. A., Bates R. P., Johnson R. P. (1990), Comparison of pre- and postfermentation ultrafiltration on the characteristics of sulfated and non-sulfated white wines, *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 182-185.

Sols A., Gancedo C., Delafuente G., (1971), Energy-yielding metabolism in yeast. *The yeasts*, Acad. Pres. (Ed.), Londra-New York.

Soufleros E. H., Ageliki Mygdalia S. Natskoulis P. (2004), Characterization and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate “Mouro” by flavor compounds and mineral analysis, *Food Chem.*, **86**: 625-636.

Tappel A. L., (1966), Effects of low temperatures and freezing on enzymes and enzyme systems, H.T. Meryman, Ed. *Cryobiology*, New York, Academic Press, 163-177.

Taylor S. L., Higley N. A., Bush R. K., (1986), Sulfites in foods: Uses, analytical methods residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity, *Adv. Food Res.*, **30**: 1-76.

Thurston P. A., Taylor e Ahvenainen J., (1981), Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate ester, *J. Inst. Brew.*, **87**: 92-95.

Tolbert N. E., (1973), Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts, *Plant Physiol.*, **51**: 234-244.

Traverso-Rueda S., Singleton V. L., (1973), Catecholase activity in grape juice and its implications in winemaking, *Am. J. Enol. Vitic.*, **3**: 103-109.

Török T., Mortimer R. K., Romano P., Suzzi G., Polsinelli M., (1996), Quest for wine yeast-an old story revisited, *J. Ind. Microbiol.*, **17**: 303-313.

Usseglio-Tomasset L., (1971), Le caratteristiche della grappa derivanti dall'evoluzione dei costituenti volatili delle vinacce durante il periodo di insilamento e dalle modificazioni apportate dal processo di distillazione, *Vini D'Italia*, **13**: 453-462.

Usseglio-Tomasset L., (1978), Gli alcoli superiori: un problema per la grappa, *Vini d'Italia*, **116**: 291-294.

Valero E., García-Carmona F., (1998), pH-dependent effect of sodium chloride on latent grape polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **46 (7)**: 2447-2451.

Vámos-Vigyázó L., (1981), Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **15**: 49-127.

Vaughn K. C., Duke S. O., (1984), Function of polyphenol oxidase in higher plants, *Physiol. Plant.*, **60**: 106-112.

Vaughan-Martini A., Martini A., (1995), Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism, *J. Ind. Microbiol.*, **14**: 514-522.

Venturini, N., (1998), La grappa in casa. Tutto quello che bisogna sapere per fare e scegliere una grappa di qualità, MEB (Ed.), Padova.

Versini G.; Margheri G., (1979), Rapporto tra i costituenti volatili della Grappa e le caratteristiche organolettiche, *Vini D'Italia*, **21**: 269-277.

Versini G., Orriols I., Dalla Serra A., (1994), Aroma components of Galician Albariño, Loureira and Godello wines, *Vitis*, **33**: 165-170.

Versini G.; Serra-Adalla A.; Monetti A.; Inama S.; Ramponi M., (1995), Analytical differences among grape marc distillates (grappa) of Trentino on the basis of different traditional distillation methods and factory process, *Riv. Sci. Alim.*, **24**: 427-436.

Walker J. R. L. (1977), Enzymatic browning in foods. Its chemistry and control, *Food Technol., NZ*, **12**: 19-25.

Weemaes C. A., Ludikhuyze L. R., Van den Broeck I., Hendrickx M. E., Tobback P. P., (1998), Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes pears and plums, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **31**: 44-49.

Whitaker J. R. (1972 b) Effect of pH on rates of enzyme-catalyzed reactions, O. R. Fennema, Eds. Principles of enzymology for the Food Sci., Chapter 10, New York, Marcel Dekker.

Whitaker J. R. & Lee, C. Y., (1995) Recent advances in chemistry of enzymatic browning, C. Y. Lee & J. R. Whitaker, Eds. Enzymatic Browning and Its Prevention., ACS Symposium Series 600, Washington, DC, American Chemical Society, 2-7.

Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B., (1985), Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers, *Anal. Chem.*, **57**: 675-679.

Winder A. J., Harris H., (1991), New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase, *Eur. J. Biochem.*, **198**: 317-326.

Zambonelli C., (1998), Microbiologia e biotecnologia dei vini, Edagricole (Ed.), Bologna, 35, 70, 74, 109.

Zawitowski, J., Biliaderis, C. G., Eskin, N. A. M., (1991), Polyphenoloxidase. In: Oxidative Enzymes in Foods. Robinson, D.S., Eskin, N. A. M., Ed. Elsevier Science Publishing, New York, 217-273.

Zocca F., (2006) Enzymes of technological interest in Italian autochthonous grapes and their pomace, *11th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research in Food Science and Technology*, 292-296.

Zocca F., Lomolino G., Curioni A., Spettoli P., Lante A., (2007) Detection of pectinmethylesterase activity in presence of methanol during grape pomace storage, *Food Chem.*, **102**: 59-65.

Zocca F., Lomolino G., Spettoli P., Lante A., (2007) Deriphat 2-DE to visualize polyphenol oxidase in Moscato and Prosecco grapes, *Electrophoresis*, **28**: 3992-3997.

Zocca F., Lomolino G., Spettoli P., Lante A., (2007) In press Estrazione e parziale caratterizzazione di polifenolossidasi di uve Moscato e Prosecco, *8° Congresso di Scienza e Tecnologia degli Alimenti*.

SITI INTERNET

<http://www.expasy.org/tools/findmod/>

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento va alla mia famiglia per essermi stata sempre vicina.

Un grazie particolare alla Prof.ssa (Anna Lante) e alla Giovanna per l'aiuto e la stima che continuano a dimostrarmi.

Grazie al Prof. Paolo Spettoli per le riletture critiche dei lavori pubblicati.

Grazie alla Dott.ssa Roberta Seraglia e al Prof. Pietro Traldi del CNR di Padova per il prezioso contributo nell'analisi proteomica dell'enzima PPO.

Grazie al Dott. Vincenzo Lionetti per la determinazione del grado di metilazione e del contenuto di acidi uronici delle bucce d'uva.

Grazie alla Dott.ssa Laura Camardella per aver fornito l'inibitore PME1 purificato.

La mia infinita gratitudine va alle mie compagne di viaggio le Dott.sse Mariangela De Zorzi, Elisa Selvatico e Irene Suglia, per il loro costante sostegno.

Grazie ai "tennici" Stefania, Mara e Federico e alla Dott.ssa Irene Bozzolan per il loro prezioso contributo "tennico".

Grazie alle persone che ho incontrato nel passato, che sono con me nel presente e mi accompagneranno in futuro.