



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

TESI DI LAUREA SPECIALISTICA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

*DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ PECTIN METILESTERASICA E
POLIFENOLOSSIDASICA IN VITIGNI A BACCA BIANCA*

Relatore:

Ch.ma Prof.ssa Anna Lante

Correlatore:

Dott. Federico Zocca

Laureando:

Mattia Girardi

Matricola n. 566943

ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009

RIASSUNTO

L'oggetto della tesi è stato lo studio degli enzimi polifenol ossidasi e pectin metilesterasi in uve delle varietà Cortese, Moscato, Garganega, Trebbiano e Durella. La polifenol ossidasi riveste un elevato interesse tecnologico in quanto provoca l'imbrunimento enzimatico del mosto e del vino. La pectin metilesterasi partecipa alla degradazione della pectina contribuendo all'abbassamento della torbidità del mosto e alla produzione di metanolo. L'obiettivo è stato quello di valutare qualitativamente e quantitativamente l'attività polifenolossidasi e pectin metilesterasi, nei vitigni presi in considerazione. I risultati ottenuti hanno fatto emergere la presenza di significative differenze inter- e intravarietal. Per l'enzima polifenol ossidasi è stato determinato l'effetto che l'etanolo e altri inibitori possono avere sull'attività enzimatica.

ABSTRACT

The subject of the thesis was the study of the enzyme polyphenol oxidase and pectin methylesterase in grape varieties Cortese, Moscato, Garganega, Trebbiano and Durella. The polyphenol oxidase is an enzyme with high technological interest because it causes the enzymatic browning of must and wine. The enzyme pectin methylesterase is involved in the degradation of pectins, the decrease of turbidity of must and methanol production. The objective was to evaluate the activities of the enzymes polyphenol oxidase and pectin methylesterase in grapes. The results obtained have revealed the presence of significant differences between the varieties. For the enzyme polyphenol oxidase the effect of ethanol and other inhibitors was evaluated.

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
1.1 Valutazione dell'imbrunimento enzimatico.....	9
1.2 Polifenol ossidasi (PPO).....	12
1.3 Le polifenol ossidasi dell'uva	17
1.4 Imbrunimento enzimatico del vino.....	18
1.5 Controllo dell'imbrunimento nell'industria alimentare.....	21
1.5.1 Mezzi fisici.....	21
1.5.2 Mezzi chimici	23
1.6 Pectin metilesterasi (PME).....	32
1.7 Inibizione della PME	35
2. SCOPO DELLA TESI.....	37
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Uva.....	39
3.2 Estrazione del succo d'uva.....	39
3.3 Determinazione della proteina	39
3.4 Determinazione spettrofotometrica dell'attività polifenolossidasi.....	40
3.5 Effetto dell'etanolo sull'attività polifenolossidasi	40
3.6 Preparazione in sistema modello dei prodotti della reazione di Maillard	41
3.7 Inibizione su piastra dell'attività polifenolossidasi	41
3.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PPO).....	42
3.9 Zimogrammi dell'attività polifenolossidasi (L-DOPA/MBTH)	42
3.10 Determinazione su piastra dell'attività pectin metilesterasi	43

3.11	Analisi statistica.....	44
4.	RISULTATI E DISCUSSIONE	45
5.	CONCLUSIONI.....	51
6.	ALLEGATI.....	53
7.	BIBLIOGRAFIA.....	61

1. INTRODUZIONE

Gli enzimi sono i principali responsabili delle trasformazioni biochimiche che coinvolgono i diversi composti dell'uva nella produzione del vino.

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 le quali possono modificare, in maniera significativa, le caratteristiche della materia prima.

Tra gli enzimi propri dell'uva attivi durante le trasformazioni enologiche si possono riscontrare molti che hanno azioni positive sulla qualità finale del vino (es. β -glucosidasi ed esterasi) altri invece determinano caratteristiche negative per le proprietà organolettiche del prodotto. Quest'ultimo è il caso della polifenolossidasi (PPO), enzima ossidasico presente nell'uva.

La PPO ha il ruolo fisiologico di catalizzare l'ossidazione di composti fenolici in chinoni, sostanze biologicamente molto attive che provocano l'imbrunimento del prodotto alimentare sul quale sono formate.

La reazione di biosintesi dei chinoni a partire da polifenoli si ripete anche nel succo d'uva in seguito alle operazioni di raccolta e soprattutto di pressatura. Tali operazioni provocano la rottura della struttura della cellula e quindi il contatto tra la PPO ed i substrati fenolici.

Attualmente il metodo più efficace nel controllo dell'attività PPO è l'impiego dell' SO_2 . Questo additivo però può presentare rilevanti effetti negativi sulla salute del consumatore (dermatiti, problemi respiratori) e quindi si sta progressivamente cercando, per quando possibile, di limitare il suo uso con la prospettiva di sostituirlo con altri antiossidanti dotati del medesimo effetto, ma con minore impatto sulla salute umana. Alla luce di queste considerazioni, diventa indispensabile la conoscenza della materia prima di partenza e dell'attività PPO per dosare, in modo mirato, i solfiti.

La tesi si propone di esaminare quantitativamente e qualitativamente la PPO di alcuni vitigni a bacca bianca come Cortese, Moscato, Garganega, Trebbiano e Durella verificando l'effetto esplicato dall'etanolo e di altri inibitori sull'attività dell'enzima.

La pectin metilesterasi (PME) è uno dei principali enzimi responsabili della degradazione delle pectine delle pareti cellulari. La sua azione nel mosto d'uva è considerata positiva per favorire la destabilizzazione delle sostanze pectiche in soluzione causandone la precipitazione, ma può anche comportare incrementi della concentrazione di metanolo. Molto spesso preparati commerciali a base di enzimi pectinolitici sono aggiunti appositamente al vino per favorire le operazioni di chiarifica, a prescindere dalla dotazione endogena dell'enzima e non valutando le possibili conseguenze.

La conoscenza di questo parametro potrebbe perciò essere importante anche dal punto di vista economico-gestionale, permettendo un intervento più mirato. Le medesime varietà utilizzate per la determinazione della PPO sono state quindi impiegate nei saggi su piastra per l'analisi della PME.

1.1 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 polifenoli o da altri composti 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 ossidasi (**Fig. 1**).

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 (**Fig. 2**).

La reazione è catalizzata dall'enzima polifenol ossidasi, conosciuto anche come fenolossidasi, fenolasi, monofenolo ossidasi, difenolo ossidasi e tirosinasi. L'enzima è presente nei vegetali, funghi e crostacei e anche in alcune specie batteriche del genere *Streptomyces* (Claus & Decker, 2006).



Figura 1. Imbrunimento enzimatico in mela e banana.

SCALA D'IMBRUNIMENTO

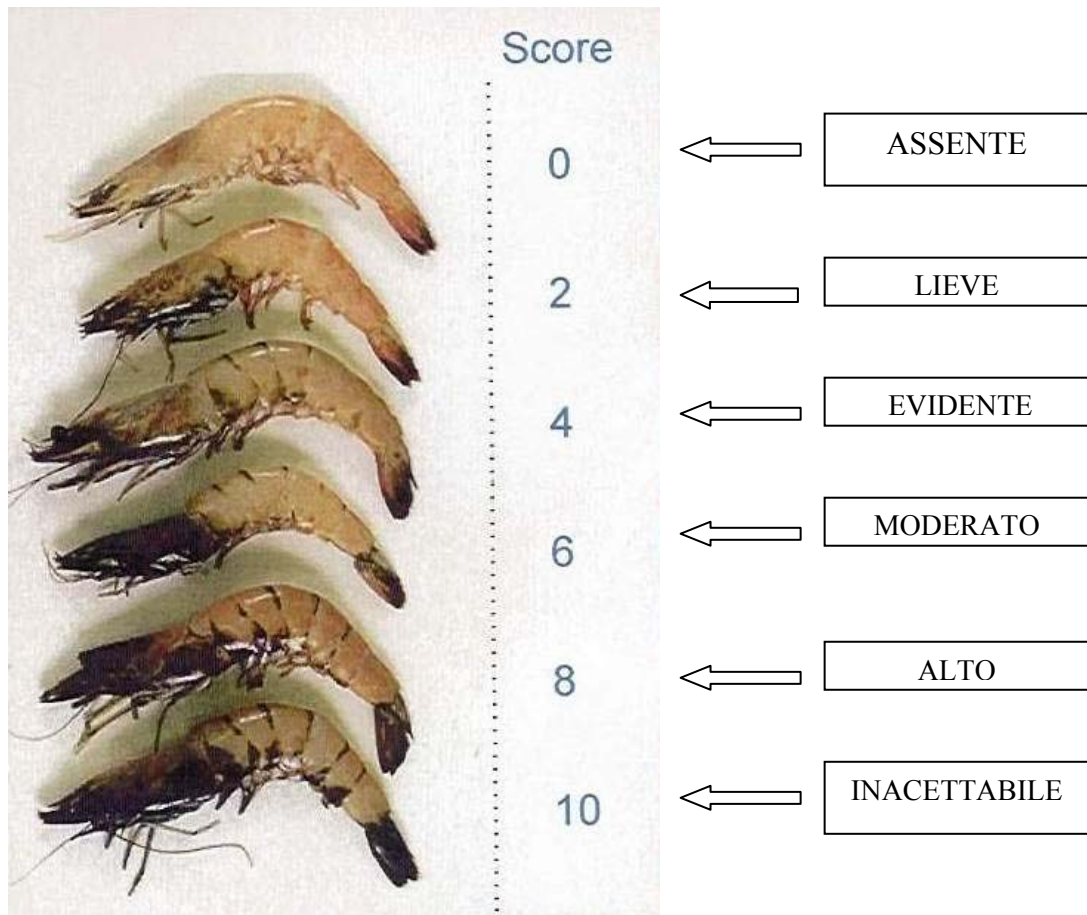


Figura 2. Scala di imbrunimento (Dr. W. S. Otwell, University of Florida).

Alcuni autori riportano che i prodotti di reazione dell'attività polifenolossidasi, i chinoni, sono in grado di reagire con altri composti, quali aminoacidi, fenoli, zuccheri e 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, difetti e quindi a costi da sostenere, nel caso del tè l'ossidazione enzimatica delle sostanze polifenoliche è una caratteristica molto positiva (Coulter, 2002). Nei semi di cacao, così

come nel caffè l'attività 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, dei datteri e dei fichi dopo la raccolta e l'appassimento.

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 fenolica 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 (**Fig. 3**). Limitare tale fenomeno nel post-raccolta è molto difficile, ma necessario per mantenere il valore economico e nutrizionale del prodotto (Marshall *et al.*, 2000).

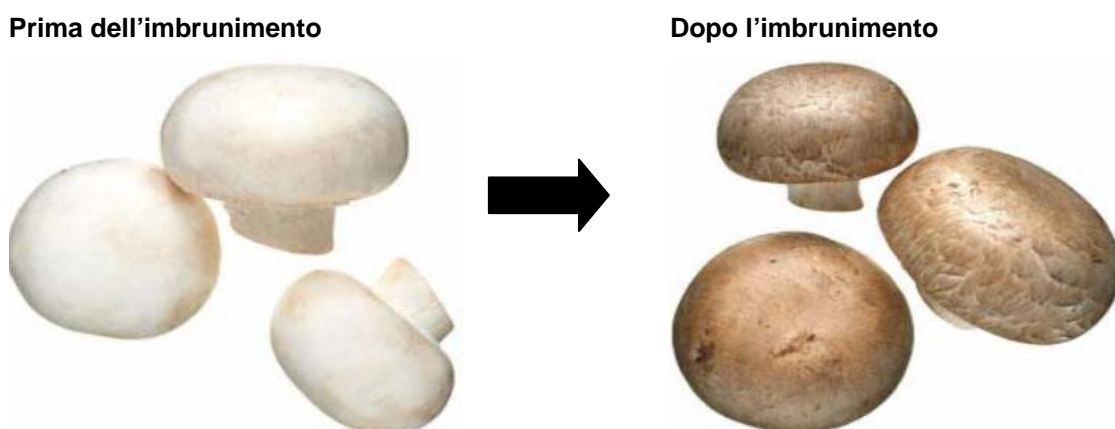


Figura 3. Imbrunimento enzimatico in *Agaricus Bisporus*: confronto tra prima e dopo la reazione di imbrunimento.

1.2 Polifenol ossidasi (PPO, E.C. 1.14.18.1, E.C. 1.10.3.1)

La polifenol ossidasi comprende essenzialmente due tipi di enzimi, l'*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).

La PPO (Rapeanu *et al.*, 2006) presenta nel sito attivo uno ione Cu^{2+} legato a sei o sette residui di istidina e un singolo residuo di cisteina (Mayer, 2006) oltre a gruppi $-\text{SH}$. Il sito attivo della PPO può presentarsi in tre forme: *met*-PPO (Cu^{2+}), *deoxy*-PPO (Cu^{1+}) e *oxy*-PPO (Cu^{2+}). La forma latente dell'enzima è la *met*-PPO e viene ridotta nella forma *deoxy*-PPO in conseguenza all'ossidazione di un monofenolo in *o*-chinone (Solomon *et al.*, 1992).

Generalmente è un enzima "intracellulare" ad esclusione di alcune piante, in cui può essere considerato "extracellulare" essendo localizzato a livello della parete. Nei funghi è solubile perchè non legato alla membrana, mentre nelle piante si trova in organelli connesso alla membrana e nella frazione solubile della cellula (Mayer & Harel, 1978). Nelle cellule vegetali è localizzato a livello della membrana tilacoidale dei cloroplasti (Nicolas *et al.*, 1994) oltre che nei mitocondri ed eccezionalmente a livello dei perossisomi (**Fig 4**). La forza di legame tra l'enzima e la membrana varia a seconda della tipologia di tessuto e dello stadio di sviluppo della pianta. In molti casi, per la solubilizzazione si utilizzano detergenti quali Triton X-100, in grado di apportare cambiamenti nella struttura dell'enzima, modificandone la specificità di substrato e l'optimum di pH. Il peso molecolare delle isoforme predominanti varia da 116000 a 128000 Da, con un minimo di 26 ÷ 32000 Da (Mayer & Harel, 1978).

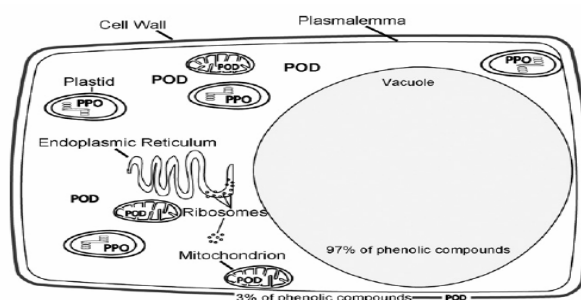
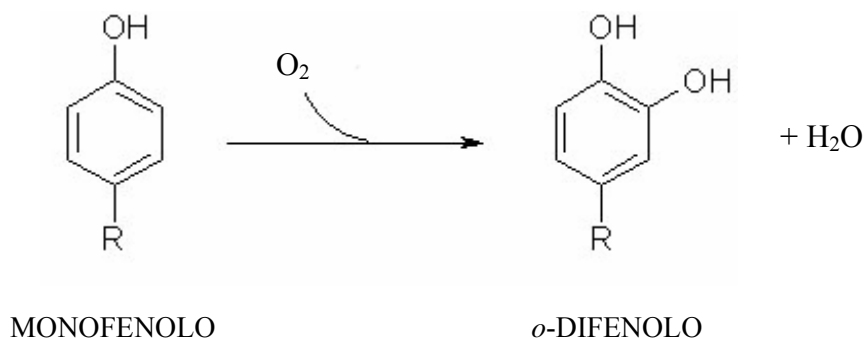


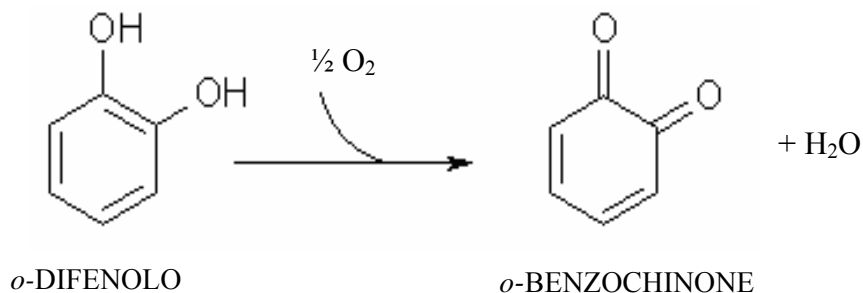
Figura 4. Compartimentazione della PPO in cellula vegetale (da Toivonen & Brummell, 2008).

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

1. *o*-idrossilazione dei monofenoli a *o*-difenoli definita come ATTIVITÀ CRESOLASICA (E.C. 1.14.18.1), nota anche con il nome di monofenolo monossigenasi.



2. ossidazione degli *o*-difenoli a *o*-chinoni definita come ATTIVITÀ CATECOLASICA (E.C. 1.10.3.1), nota anche con il nome di difenolo ossigeno ossidoreduttasi.



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

Nelle due reazioni di ossidazione enzimatica dei composti fenolici si possono osservare l'alternarsi delle tre forme di ossidazione del sito attivo della PPO. Il sito attivo dell'enzima per attivare la sequenza di ossidazione del monofenolo deve combinarsi con l'ossigeno al fine di dare la forma oxy-PPO (Lerch, 1995). Il substrato monofenolico può reagire solo la forma oxy-PPO formando il complesso PPO-ossigeno-monofenolo. La formazione del *o*-difenolo è quindi seguita dal rilascio del substrato dall'enzima e dalla conseguente conversione

del sito attivo della PPO nella forma *deoxy*-PPO. A questo punto l'enzima è pronto per un altro ciclo senza dovere ritrasformarsi nella forma latente. Nella sequenza di ossidazione dei *o*-difenoli, il substrato difenolico non reagisce solo con la forma *oxy*-PPO ma anche con la *met*-PPO (Lerch, 1995). Quest'ultima forma dell'enzima in seguito all'ossidazione di un *o*-difenolo a *o*-chinone (Fig. 6) è ridotta nella sua forma *deoxy*-PPO e successivamente tale forma combinandosi con l'ossigeno genera la *oxy*-PPO che a sua volta produce l'ossidazione di un'altra molecola di *o*-difenolo. Infine, dopo la trasformazione del substrato difenolico l'enzima viene ridotto nella forma latente (*met*-PPO) (Yoruk & Marshall, 2003).

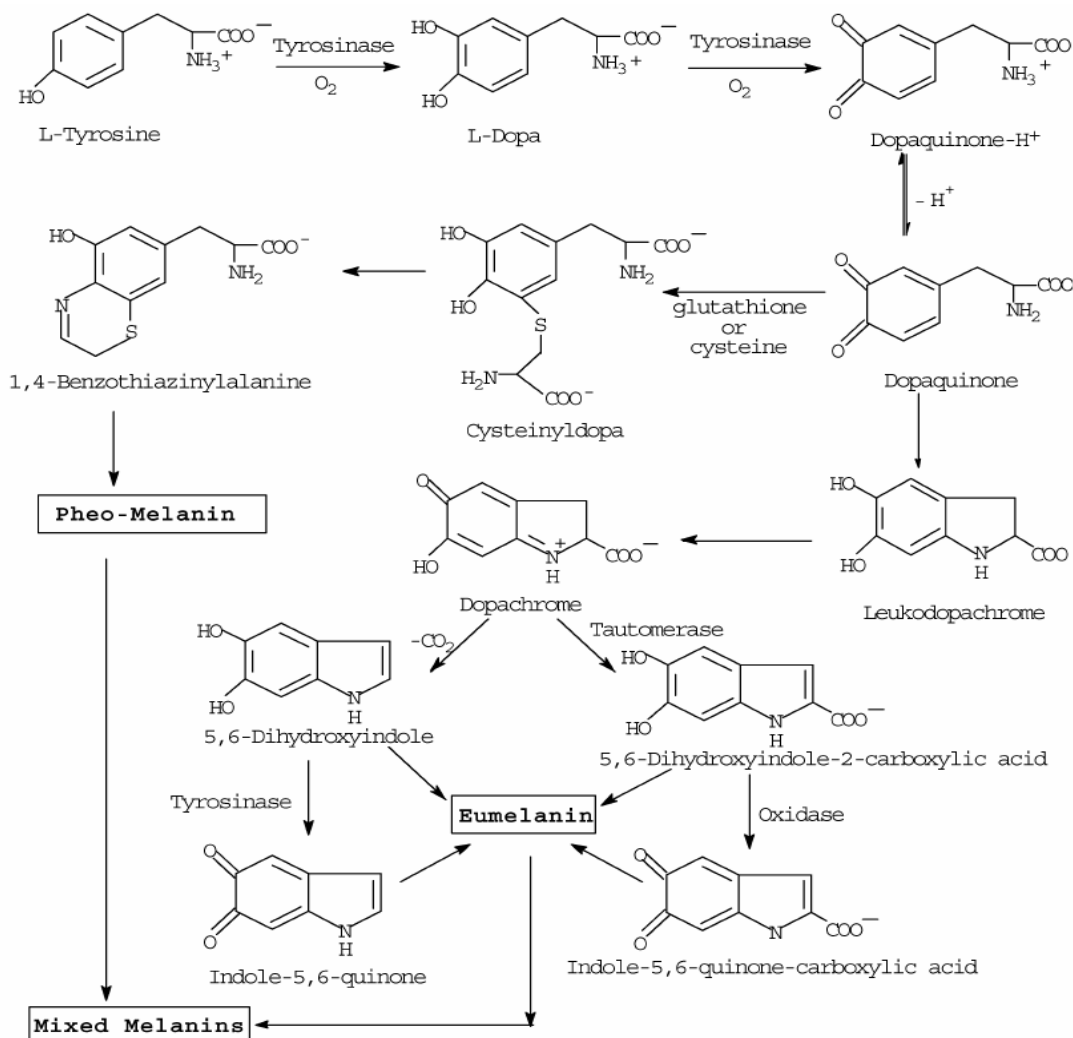


Figura 5. Sequenze di reazioni della melanogenesi catalizzata dalla PPO a partire da L-tirosina (da Seo *et al.*, 2003).

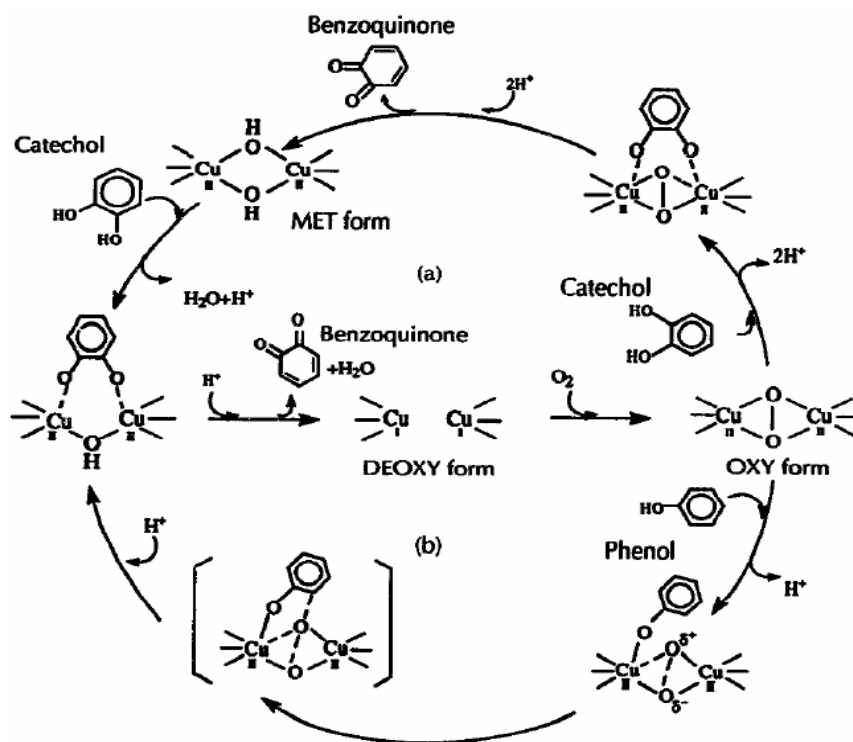


Figura 6. Attività cresolastica e catecolastica di PPO su catecolo (da Martinez & Whitaker, 1995)

L'attività catalitica della PPO è influenzata da parametri ambientali come la temperatura e il pH. La temperatura è un importante fattore che influenza significativamente l'attività catalitica della PPO (Yoruk & Marshall, 2003). È riconosciuto come l'abbassamento della temperatura causa un rallentamento della cinetica di reazione, mentre elevate temperature distruggono e denaturano la delicata struttura dell'enzima (Segel, 1976). Le variazioni di temperatura possono anche alterare la solubilità dell'ossigeno, co-substrato richiesto dalla PPO per esplicare la sua attività catalitica. La temperatura ottimale della PPO varia a seconda della sua origine; ad esempio le PPO della mela sviluppano la loro massima attività a 45°C (Zhou *et al.*, 1993) mentre le PPO dell'uva hanno l'optimum tra i 25 e i 45°C (Valero *et al.*, 1988). In generale la cinetica di inattivazione termica della PPO mostra un iniziale incremento di attività dell'enzima, attribuita all'attivazione di forme latenti, seguita da un decremento che ricalca una cinetica di primo ordine (Yoruk & Marshall, 2003). Il tempo e la temperatura richiesti per l'inattivazione termica della PPO variano a seconda dell'origine. Ad esempio nell'uva si è rilevato una riduzione del 50% dell'attività a 65°C per 20 min, mentre per avere un'inattivazione completa si

devono applicare 75°C per 15 min (Valero *et al.*, 1988). Si è osservato inoltre che in alcuni casi zuccheri e sali presenti nell'ambiente di reazione possono funzionare come agenti protettivi per l'enzima e ridurre l'efficacia del trattamento termico (Yoruk & Marshall, 2003).

Le variazioni di pH possono andare a influenzare l'attività della PPO. In particolare valori di pH fortemente acidi o molto alcalini causano un cambiamento nello stato di ionizzazione dei gruppi del sito attivo portando a cambiamenti nella conformazione del sito catalitico e che quindi impediscono all'enzima di legarsi al substrato o di catalizzare la reazione (Segel, 1976). In funzione dei valori di pH si possono avere anche la denaturazione e la riduzione di stabilità delle proteine dell'enzima. In conseguenza alle alterazioni che può produrre il pH sul sito attivo della PPO si hanno delle modificazioni anche sulla cinetica dell'attività dell'enzima (Valero & Garcia-Carmona, 1998). Il pH ottimale per la PPO varia in funzione dell'origine ma in generale è compreso tra valori di 4.0 ÷ 8.0 (Yoruk & Marshall, 2003). Le diverse isoforme di PPO presenti nelle piante possono in alcuni casi mostrare tra loro differenti valori di pH ottimali. A livello sperimentale numerosi fattori possono influenzare il pH ottimale come ad esempio il metodo di estrazione dell'enzima, la temperatura, la natura del substrato fenolico e il sistema tampone utilizzato durante la determinazione (Yoruk & Marshall, 2003).

Tra le principali proprietà chimico-fisiche della PPO assumono un certo rilievo la specificità di substrato e l'effetto di attivatori. I substrati primari della PPO sono i composti fenolici. Questi variano molto per tipo e quantità in funzione dell'origine vegetale, animale o fungina del prodotto oltre che all'interno dello stesso regno, specie e varietà. I vari substrati polifenolici possono mostrare anche diverso grado di imbrunimento. Ad esempio nell'uva le catechine monomeriche e procianidine dimeriche causano un imbrunimento molto più forte rispetto agli altri polifenoli presenti in questo frutto (Lee & Jaworski, 1998). Le isoforme di PPO di una medesima origine possono presentare diverse specificità di substrato e variazioni di attività nei confronti di monofenoli e degli *o*-difenioli (Harel *et al.*, 1964).

La PPO indipendentemente dall'origine presenta molto spesso forme latenti la cui attivazione può essere determinata da diversi tipi di sostanze o di trattamenti. In *vivo*, ad esempio, il grado di latenza può variare molto in funzione

dell'origine dell'enzima, lo stadio di sviluppo e dal tipo di attivatore presente. L'attivazione delle forme latenti può essere indotta dal freddo, dall'invecchiamento, acidi grassi, alcoli, denaturanti, detergenti, acidi e basi, trattamenti con proteasi e da trattamenti termici *mild* (Yoruk & Marshall, 2003).

1.3 Le polifenol ossidasi dell'uva

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 sovrāmatura, 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 SO₂ 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 alcol, alla diminuzione di pH e alla precipitazione delle proteine.

1.4 Imbrunimento enzimatico del vino

L'imbrunimento ossidativo è uno dei principali problemi che si incontrano durante il processo di vinificazione. L'imbrunimento ha conseguenze deleterie sia sulle proprietà sensoriali (perdita di colore, aroma e incremento dell'astringenza) (Silva Ferreira *et al.*, 2002) che sul valore nutrizionale del vino (Sioumis *et al.*, 2005). L'imbrunimento del vino può essere distinto in imbrunimento enzimatico e non-enzimatico: il primo avviene quasi interamente nel mosto d'uva mentre il secondo può avvenire nel mosto quanto nel vino (Es-Safi *et al.*, 2003). L'imbrunimento enzimatico avviene nelle prime fasi del processo di vinificazione e consiste nell'ossidazione enzimatica dei polifenoli dell'uva in presenza di ossigeno e dell'enzima polifenol ossidasi (Li *et al.*, 2008). Nel mosto d'uva, l'imbrunimento enzimatico è favorito dai flavanoli ed è in gran parte correlato al contenuto di esteri dagli acidi idrossicinnamici e l'acido tartarico. In particolare nell'uva troviamo soprattutto l'acido *trans*-caffeoiltartarico (**Fig. 7**), meglio conosciuto come acido caftarico derivante dall'esterificazione tra l'acido caffeico e l'acido tartarico e l'acido *p*-cumaroiltartarico, definito anche acido *p*-cutarico derivante dall'esterificazione tra acido *p*-cumarico e l'acido tartarico (Cheyner *et al.*, 1990). Il contenuto nel succo d'uva dell'acido caftarico è in media di 106 mg/l mentre l'acido cutarico è presente in quantità più ridotte, circa 10 mg/l (Singleton *et al.*, 1985).

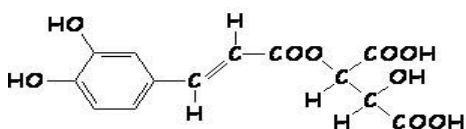


Figura 7. Struttura dell'acido caftarico o *trans*-caffeoiltartarico.

L'imbrunimento enzimatico ha inizio con l'ossidazione da parte della PPO dell'acido caftarico o dell'acido *p*-cutarico con la conseguente produzione di

acido caffeoiltartarico *o*-chinone (**Fig. 8**). Quest'ultimo composto è un forte ossidante capace di ossidare altri composti del vino estranei alla reazione di ossidazione enzimatica e provocare quindi, in funzione dei polifenoli presenti e dell'ambiente di reazione, rilevanti cambiamenti nella tonalità e nel colore del vino (Robards *et al.*, 1999). In primo luogo gli *o*-chinoni attraverso rapide reazioni di ossidrilazione con monofenoli o difenoli, portano rispettivamente alla formazione di *o*-difenoli e *o*-chinoni. In seguito a questo tipo di reazione definita di ossidazione accoppiata, catalizzata da acidi presenti nel mezzo, l'*o*-chinone può ridursi nel fenolo originario o produrre dimeri. Gli *o*-chinoni derivati dall'attività enzimatica sono in grado anche di polimerizzare e condensare con molti altri composti, sia specie di natura fenolica che non fenolica, portando infine, soprattutto in presenza di valori di pH elevati, alla formazione di pigmenti bruni (Robards *et al.*, 1999). In particolare gli *o*-chinoni essendo ossidanti possono ossidare alcuni substrati come altre sostanze fenoliche, acido ascorbico e SO₂ (Li *et al.*, 2008). Ad esempio l'acido caftarico *o*-chinone prodotto enzimaticamente, attraverso il meccanismo dell'ossidazione accoppiata, ossida la catechina a catechina *o*-chinone riducendosi simultaneamente ad acido caftarico; il chinone della catechina andrà a reagire rapidamente con altri idrochinoni (molecole ridotte di catechina o acido caftarico) formando prodotti di condensazione che possono essere ancora ossidati e polimerizzare ulteriormente (Cheynier *et al.*, 1989).

I chinoni riescono a reagire anche con composti come gli amino derivati in presenza di acqua oppure creare composti bruni in seguito a lente reazioni di polimerizzazione e condensazione con appropriati idrochinoni (Robards *et al.*, 1999).

L'acido caftarico *o*-chinone può essere parzialmente intrappolato dal glutatione ossia il riducente più efficace naturalmente presente nell'uva, andando in questo modo a diminuire la quantità di pigmenti bruni potenzialmente generabili nel mosto. In particolare il glutatione reagendo con il chinone dell'acido caftarico produce l'acido 2-S-glutationil caftarico anche conosciuto come Grape Reaction Product (GRP). Il GRP non è soggetto ad ulteriori reazioni di ossidazione per cui in una certa misura limiterà l'imbrunimento ossidativo nei mosti (Rigaud *et al.*, 1991; Singleton *et al.*, 1985). L'acido 2-S-glutationil caftarico ha dimostrato di resistere bene durante le fasi di preparazione del mosto, alla fermentazione

oltre che alla conservazione del vino per diversi anni. Inoltre il rapporto tra acido caftarico e acido S-glutationil caftarico si presenta come un utile indice di previsione dell'ossidazione del mosto e nei vini bianchi finiti (Singleton *et al.*, 1985).

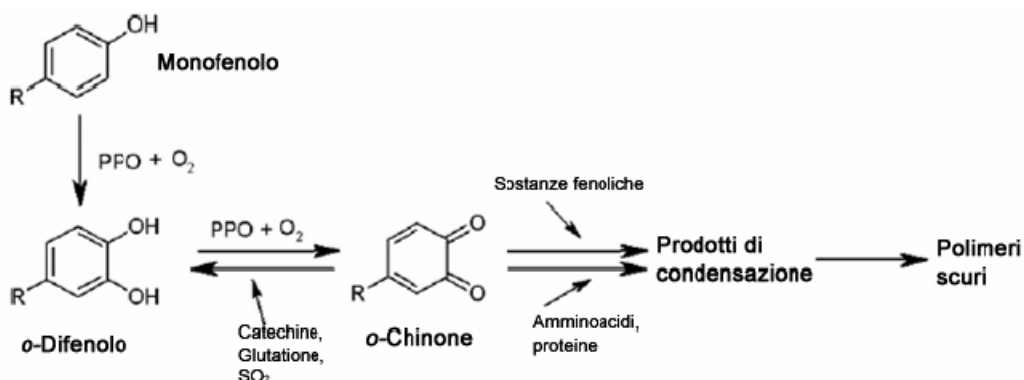


Figura 8. Processo di imbrunimento enzimatico in mosto d'uva (da Li *et al.*, 2008).

La modalità più diffusa per il controllo dell'imbrunimento enzimatico in mosti e vini è il trattamento con SO₂, la quale già a basse dosi è in grado di inattivare la catecolasi. Dall'altra parte però, l'SO₂ previene la formazione di GRP mantenendo in questo modo gli acidi caftarico e *p*-cutarico liberi e di conseguenza mantenendo un elevato potenziale di imbrunimento di tipo non-enzimatico (Li *et al.*, 2008). Per limitare l'imbrunimento enzimatico si può ricorrere nei mosti bianchi alla tecnica all'iperossigenazione che permette di ridurre il potenziale di imbrunimento attraverso due strade: la scomparsa della tirosinasi e l'esaurimento dei substrati fenolici ossidabili durante le reazioni di ossidazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

In conclusione è comunque da notare che l'attività e la concentrazione della PPO tende gradualmente ad abbassarsi durante l'ossidazione. Inoltre lo sviluppo della fermentazione, la produzione di etanolo e l'applicazione di operazioni enologiche come la chiarificazione e il trattamento con SO₂, permettono l'eliminazione della PPO nel vino (Cheynier *et al.*, 1989; Spagna *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.5 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.

1.5.1 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 minuti, 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 della 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 (**Fig. 9**).



Figura 9. 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.

1.5.2 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 biossido di zolfo (SO_2) conosciuto anche come anidride solforosa e altre forme di zolfo inorganico in grado di liberare SO_2 alle condizioni di utilizzo.

SO_2 : biossido di zolfo

SO_3^{2-} : solfito

HSO_3^- : bisolfito

$\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$: 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 SO_2 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.

In ogni caso, l'aggiunta di SO₂ agli alimenti ha fatto emergere molte obiezioni di natura salutistica dovute alle reazioni allergiche che colpiscono gli individui sensibili ai solfiti. Il costante aumento di questi casi ha portato la World Health Organization (WHO) e l'International Organization of Vine and Wine (O.I.V) a emanare regolamentazioni restrittive per l'uso dei solfiti (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La WHO e la FAO hanno raccomandato un'assunzione giornaliera massima di solfiti tollerabile per la salute umana compresa tra 0 ÷ 0.7 mg di SO₂ per Kg di peso corporeo. Inoltre l'aggiunta di SO₂ a concentrazioni superiori a quelle imposte per legge provoca conseguenze sia a livello salutistico per i consumatori che riflessi negativi sulla qualità dell'alimento. Ad esempio l'uso eccessivo di SO₂ nel mosto d'uva e nel vino provoca la formazione di aromi sgradevoli e può favorire l'incurimento del vino durante la conservazione (Li *et al.*, 2008).

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). 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). Infatti l'L(+)-acido ascorbico è in grado di ridurre gli o-chinoni (prodotti dalla reazione di ossidazione enzimatica) in o-difenoli andando in questo modo a ritardare la biosintesi di composti bruni senza però riuscire a bloccarla definitivamente. Tale meccanismo di inibizione presenta come effetto negativo secondario l'accumulo di o-difenoli, i quali, non appena l' L(+)-acido ascorbico sarà completamente degradato, produrranno indirettamente l'attivazione della sequenza di reazioni biochimiche che porterà alla loro stessa ossidazione (Ros *et al.*, 1993). 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 Cu²⁺ presente nel sito attivo dell'enzima (Whitaker, 1972).

A livello pratico l' L(+)-acido ascorbico presenta lo svantaggio di essere velocemente ossidato e decomposto in soluzioni acquose. Per risolvere tale problema si ricorre all'utilizzo di derivati dell'acido ascorbico come il **magnesio-**

L-ascorbil-2-fosfato (MAF) (Fig. 10). Il MAF esplica la sua attività riducente in seguito alla sua idrolisi in acido ascorbico ad opera di fosfatasi, ma allo stesso tempo è stabile in soluzioni acquose. Al momento il suo utilizzo è limitato al campo dermatologico (infatti sulla pelle può trovare le fosfatasi che permettono di esplicare l'attività riducente) nel quale ha dato risultati contrastanti nel controllo dell'attività della tirosinasi e della conseguente melanogenesi (Kameyama *et al.*, 1996; Curto *et al.*, 1999).

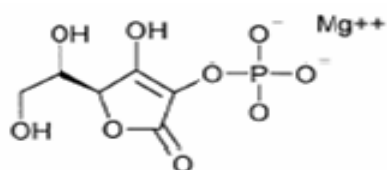


Figura 10. Struttura del magnesio-L-ascorbil-2-fosfato

La cisteina è un amminoacido non essenziale presente in un'ampia gamma di alimenti, tra cui, in primis i cereali. Gli amminoacidi solforati (in particolar modo la cisteina) hanno sempre mostrato una buona efficacia nel prevenire l'imbrunimento degli alimenti attraverso l'intrappolamento dei composti intermedi oltre che a ridurre la tossicità dei composti derivati dall'imbrunimento impedendo la trasformazione di questi in forme biologicamente attive (Friedman & Molnar-Perl, 1990). I principali studi effettuati sulla capacità della cisteina di contrastare l'imbrunimento enzimatico ha dimostrato che l'amminoacido non agisce direttamente sull'enzima PPO (Richard-Forget *et al.*, 1992; Friedman & Molnar-Perl, 1990). Si è invece osservato che l'azione antimbrunente di questo amminoacido solforato si esplica principalmente a carico degli o-chinoni generati dalla reazione di ossidazione enzimatica. In particolare il gruppo sulfidrilico della cisteina per mezzo di una reazione di addizione nucleofila con i chinoni genera un addotto solforato che evita la formazione di composti scuri. Infatti questo composto di addizione cisteina-chinone (CQAC) non rappresenta un substrato per la PPO mostrando invece proprietà di inibizione competitiva (in quanto presenta un'affinità per il sito attivo molto più elevata rispetto ai precursori) nei confronti di questo enzima ossidoreduttasico.

Richard-Forget *et al.* (1992) ha rilevato che l'effetto di inibizione del CQAC è direttamente correlato alla concentrazione iniziale di cisteina. In conseguenza a questo si possono avere due diversi risultati sull'inibizione dell'imbrunimento in

funzione del rapporto cisteina/polifenoli. Nel caso di un rapporto cisteina/polifenoli superiore a 1 non si ha imbrunimento in quanto i polifenoli sono tutti degradati a CQAC. Invece nella seconda circostanza di un rapporto cisteina/polifenoli inferiore a 1 permette soltanto una parziale conversione degli *o*-chinoni nell'adotto solforato e quindi gli *o*-chinoni liberi tenderanno a reagire con i CQAC rigenerando, attraverso reazioni di ossidazione accoppiata, i polifenoli d'origine (che rappresentano un'ulteriore substrato di reazione per la PPO) (**Fig 11**). In questo ultimo caso si noter  la formazione di composti bruni.

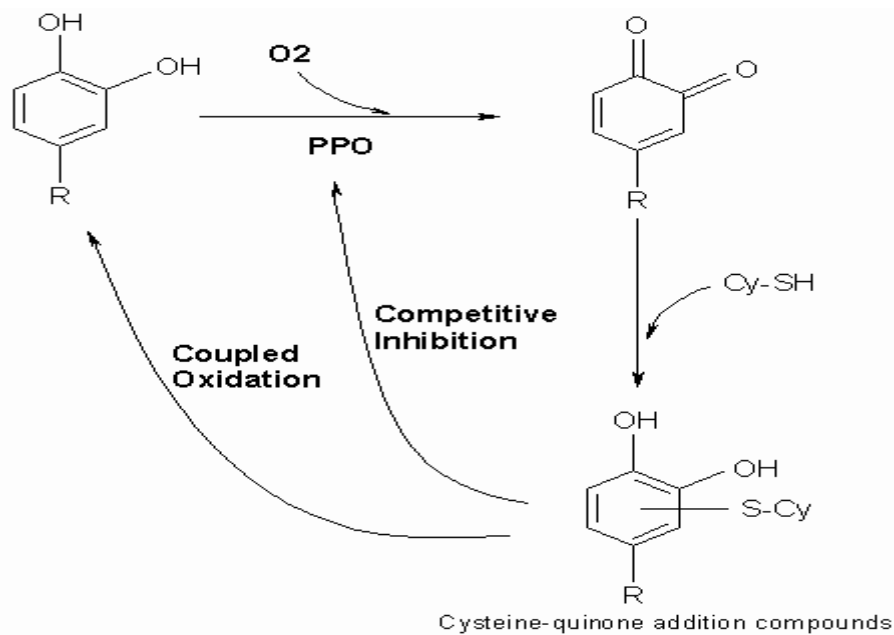


Figura 11. Effetto della cisteina e del composto di addizione cisteina-chinone (CQAC) sull'ossidazione enzimatica degli *o*-difenoli (da Marshall *et al.*, 2000).

Per quanto fin qui visto si potrebbe proporre l'utilizzo della cisteina in dosi tali da avere sempre un eccesso dell'amminoacido solforato allo scopo di permettere una protezione permanente contro l'attivit  della PPO. Nella pratica questo non   applicabile perch  la cisteina, oltre certi livelli, incide negativamente sulle propriet  sensoriale del prodotto (es. sviluppo odori di uova marce). E quindi necessario prevedere l'utilizzo della cisteina in associazione con altri additivi che permettono di ottimizzare il controllo dell'imbrunimento enzimatico.

Secondo un parere dell'EFSA (2006) l'aggiunta di L-cisteina (e di amminoacidi in generale) a prodotti alimentari (in questo caso si trattava di alimenti per

l'infanzia) deve ricevere l'autorizzazione soltanto se finalizzata a migliorare il valore nutrizionale dell'alimento. In conseguenza a questo l'aggiunta della cisteina come additivo a scopo tecnologico non crea alcun problema a livello di sicurezza alimentare.

I prodotti della reazione di Maillard (PRM) possono influenzare l'imbrunimento enzimatico catalizzato dalla PPO (Billaud *et al*, 2003). Il profilo di inibizione dei PRM variano molto in funzione del tipo di PPO e del substrato impiegato. In prove di inibizione effettuate su PPO estratta da mela (Roux *et al*, 2003) si è osservato che l'attività residua dell'enzima tende a diminuire all'aumentare del tempo di riscaldamento impiegato per ottenere i PRM. Inoltre PRM prodotti a partire da una miscela glucosio/cisteina hanno una inibizione più elevata rispetto ai derivati della reazione di Maillard generati da una miscela fruttosio/cisteina (ovviamente entrambe le miscele sono preparate e riscaldate nelle medesime condizioni). Il tipo di inibizione esercitato dai PRM non è di facile individuazione in quanto questi composti esercitano una forte inibizione, ma sia a basse quantità che a dosi elevate fanno osservare la permanenza di una ridotta attività residua. Tale comportamento non è consono agli inibitori di tipo classico (i quali possiedono inibizione pura di tipo competitivo, non competitivo o incompetivo) che mostrano inibizione completa dell'enzima quando testati in dosi alte. Le caratteristiche di inibizione esercitata dai PRM sono quindi ascrivibili a inibitori di tipo misto.

Il meccanismo di inibizione dei PRM è stato individuato nella loro attitudine nel chelare il rame (indispensabile per il sito attivo della PPO) oltre che in una presunta denaturazione, attraverso la liberazione di radicali liberi, effettuata a carico di residui amminoacidici del sito attivo dell'enzima. Questo spiega la capacità dei PRM di inattivare direttamente la PPO (anche in assenza di substrato), cosa che non può essere fatta dalla sola cisteina. L'inibizione esplicata dai PRM sulla PPO è solo parzialmente reversibile (Roux *et al.*, 2003).

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 (**Fig. 12**).

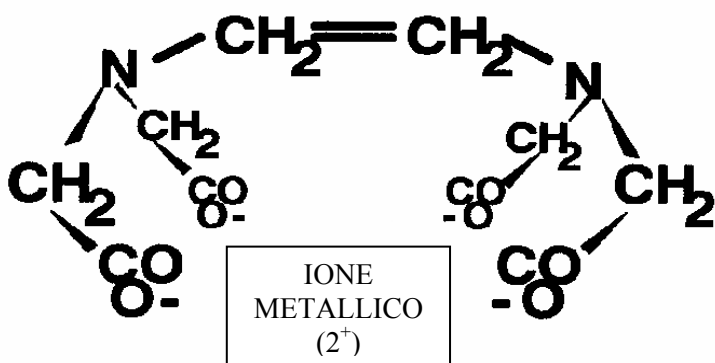


Figura 12. Complesso EDTA ione metallico.

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 (5-idrossi-2-idrossimetil- γ -pirone), è un metabolita fungino prodotto da *Aspergillus* e *Penicillium*. È presente in molti alimenti orientali fermentati e possiede attività antibatterica e antifungina. È un ottimo chelante di ioni metallici quali Fe^{3+} e Cu^{2+} (Beèlik, 1956). Acido ascorbico e kojico utilizzati sinergicamente fungono da agenti antimbrunimento. L'acido Kojico ha mostrato avere diversa capacità di inibizione sulla PPO a seconda dell'origine dell'enzima (fungina, vegetale o animale). Infatti l'inibizione di PPO derivate da mela e patata sono state inibite con molta meno efficacia rispetto a tirosinasi fungina (Chen *et al.*, 1991a). In particolare l'acido Kojico presenta inibizione di tipo competitivo per PPO di mela e patata mentre ha inibizione mista per PPO estratta da crostacei. Invece nel caso di PPO fungina, l'acido Kojico manifesta inibizione competitiva per substrati monofenolici (L-tirosina) ma un'inibizione di tipo misto per substrati difenolici (DL-Dopa).

Il meccanismo d'azione dell'acido Kojico sulle diverse PPO viene sostanzialmente spiegato attraverso due modi (Chen *et al.*, 1991b): il primo è stato individuato nell'alterazione dell'assorbimento dell'ossigeno richiesto per la reazione enzimatica mentre il secondo è dato dalla riduzione in difenoli dei chinoni prevenendo la polimerizzazione di quest'ultimi e quindi la conseguente formazione di melanine. Ovviamente l'inibizione può derivare anche dalla combinazione delle due azioni appena descritte. Si è inoltre osservato che l'acido Kojico non lega irreversibilmente l'enzima per cui la sua inibizione sulla PPO è reversibile. L'acido Kojico ha dimostrato di essere un efficace inibitore dell'imbrunimento enzimatico sia a temperature ambiente che a quelle di refrigerazione (Chen *et al.*, 1991b). Al fine di migliorarne la solubilità e altre caratteristiche (come il miglioramento della stabilità agli UV) è stata proposta anche la possibilità di glicosilare l'acido Kojico attraverso l'utilizzo di specifici enzimi (Sugimoto *et al.*, 2007).

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 (Vámos-Vigyázò, 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.

L'arbutina è un glicoside in cui un idrochinone è legato attraverso legame glucosidico a una molecola di glucosio. L'arbutina utilizzata in campo alimentare ma soprattutto come componente di cosmetici è normalmente di estrazione vegetale. In natura è contenuto in varie piante appartenenti alle famiglie *Ericacee* (ad esempio *Arctostaphylos uva ursi* (L.) *Sprengel* meglio conosciuta come uva ursina), *Rosacee* e *Sassifragacee*. Funayama *et al.* (1995) hanno proposto la produzione su scala industriale dell' α -anomero dell'arbutina attraverso l'utilizzo dell'enzima glucoside sintetasi, ricavato da *Bacillus subtilis*, a partire dall'idrochinone e dall'amido. Con il termine arbutina viene comunemente definito il *4-idrossifenil-O- β -D-glucopiranoside* che si distingue per rotazione ottica e specificità di inibizione dal suo isomero *4-idrossifenil-O- α -D-glucopiranoside* generalmente chiamato α -arbutina (Sugimoto *et al.*, 2007) (**Fig. 13**). Come appena anticipato i due isomeri mostrano una diversa specificità contro tirosinasi di diversa natura. L' α -arbutina non inibisce la PPO fungina mentre la β -arbutina è in grado di inibirla efficacemente. D'altra parte però l' α -arbutina contrasta l'attività della tirosinasi derivata da melanoma di topo molto più fortemente rispetto alla β -arbutina (Funayama *et al.*, 1995).

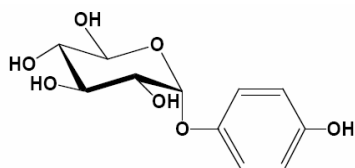


Figura 13. Struttura dell' α -arbutina

La cinetica di inibizione dell' arbutina sulla tirosinasi fungina analizzata attraverso il diagramma dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk mostra una inibizione di tipo competitivo (Tomita *et al.*, 1990). Hori *et al.* (2004) lavorando con tirosinasi fungina ha ipotizzato che l'azione inibitrice dell'arbutina potrebbe essere basata sulla capacità di questa sostanza di legarsi come un substrato analogo a un monofenolo alla forma *met* della PPO (*met*tirosinasi o E_{met}), formando in questo modo un complesso inattivo. Il complesso E_{met} -arbutina sembra quindi rappresentare il "vicolo cieco" della pathway di ossidazione della

tirosinasi (**Fig. 14**). Tale teoria sembra essere sostenuta da quanto riportato in un altro lavoro nel quale si riporta che i monofenoli possono reagire solo con la forma *oxy* della PPO secondo un meccanismo in sequenza (Wilcox *et al.*, 1985). La forma *oxy* è di solito presente in piccole quantità nella tirosinasi commerciale.

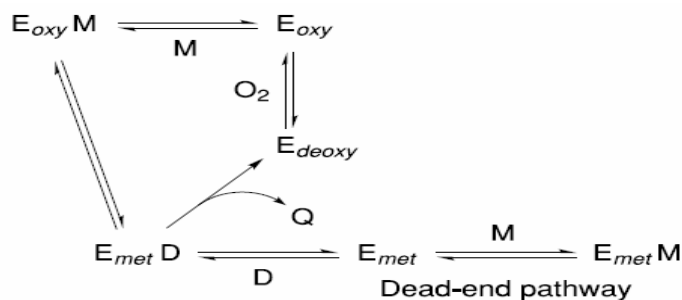


Figura 14. Meccanismo d'azione della tirosinasi su substrato monofenolico come l'arbutina (monofenolo M, difenolo D, chinone Q, *met*tirosina E_{met} , oxytirosina E_{oxy} , deoxytirosina E_{deoxy}) (Hori *et al.*, 2004).

L'attività di inibizione dell'arbutina può essere spiegata anche attraverso le sue specifiche caratteristiche strutturali. Infatti l'ingombro polare del glucosio presente a una estremità della molecola dell'arbutina, può non essere ben avvolto dalla cavità formata dalle proteine idrofobiche che circondano il sito attivo della PPO (Decker *et al.*, 2000). Un requisito strutturale che deve possedere il substrato monofenolico, per essere trasformato in difenolo dalla tirosinasi, è l'abilità di riarrangiarsi durante l'idrossilazione ossia portarsi da una posizione assiale a una posizione equatoriale all'interno del sito attivo coordinato da due atomi di rame. La molecola di glucosio presente nell'arbutina potrebbe quindi presentare una barriera al riarrangiamento nella cavità proteica dell'enzima (Wilcox *et al.*, 1985).

L'associazione dell'arbutina con l'acido L-ascorbico ha dimostrato avere un effetto positivo contro l'imbrunimento. La combinazione di queste due sostanze si è rivelata utile soprattutto in condizioni di concentrazioni di ossigeno limitate (Hori *et al.*, 2004).

Si deve comunque ricordare che l'arbutina, seppur molto lentamente, è anch'essa ossidata dalla PPO come un substrato monofenolico. L'ossidazione dell'arbutina viene accelerata non appena si rende disponibile come co-fattore

una certa quantità L-Dopa. In ogni caso, l'ossidazione enzimatica dell'arbutina non produce sostanze colorate rilevabili (Hori *et al.*, 2004).

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.

1.6 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 funghi, 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 (**Fig. 15**) 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.

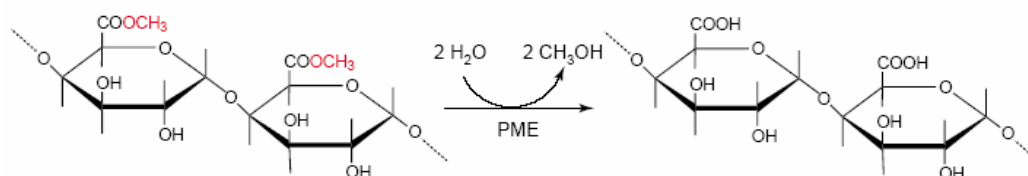


Figura 15. Meccanismo di idrolisi della pectin metilesterasi.

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).

1.7 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 poiché 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.

2. SCOPO DELLA TESI

L'importanza tecnologica delle attività polifenolossidasiche e pectin metilesterasiche nella trasformazione dei vegetali è un costante stimolo alla messa a punto di sempre più efficienti sistemi di controllo. Partendo da questi presupposti, anche nel settore enologico, diventa necessario caratterizzare in modo approfondito questi enzimi in quanto la loro attività, oltre ad essere strettamente legata alla specie e alla varietà, può mutare in base alle condizioni analitiche utilizzate.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di determinare le attività polifenolossidasiche e pectin metilesterasiche in alcuni vitigni a bacca bianca, evidenziando, a livello quantitativo e qualitativo, le eventuali differenze intra- ed intervarietali.

È stato anche valutato sull'attività polifenolossidasiche, con misure spettrofotometriche e test su piastra, il possibile effetto inibitorio dell'etanolo e di alcuni inibitori "alternativi".

3. MATERIALI E METODI

3.1 Uva

Per gli esperimenti di laboratorio sono state impiegate uve Cortese (*Vitis vinifera* cv. Cortese) (2 campioni), Moscato (*Vitis vinifera* cv. Moscato bianco) (4 campioni), Garganega (*Vitis vinifera* cv. Garganega), Trebbiano (*Vitis vinifera* cv. Trebbiano toscano) e Durella (*Vitis vinifera* cv Durella) raccolte nella vendemmia 2008. Le uve sono state conservate a -20°C per essere, successivamente, sottoposte all'estrazione del succo e alle analisi chimiche.

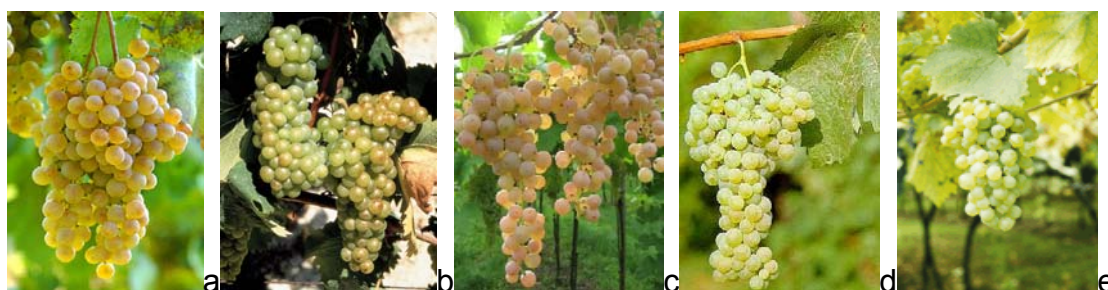


Figura 16. Immagini delle 5 varietà impiegate nelle prove di laboratorio: Cortese (a), Moscato (b), Garganega (c), Trebbiano toscano (d), Durella (e).

3.2 Estrazione del succo d'uva

Il succo d'uva è stato ottenuto attraverso la spremitura manuale di alcuni acini ($\approx 10\text{g}$), posti in un becker, con l'aggiunta di polivinilpolipirrolidone (PVPP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) in quantità dell' 1% (p/v) dell'uva spremuta. Il succo estratto veniva centrifugato per 5 min a 5000 rpm. Successivamente il surnatante è stato prelevato e centrifugato per 2 min a 14000 rpm. Infine il succo è stato conservato in bagno di ghiaccio.

3.3 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), 0.9 ml di H₂O

Milli-Q e 100 µl di succo d'uva centrifugato per 3 min a 14000 rpm. Nella prova in bianco è stata utilizzata la stessa miscela di reattivi in assenza del succo. I valori di assorbanza, sono stati determinati a 595 nm, utilizzando come riferimento albumina di siero bovina (BSA, BIO-RAD, Milano, Italia). Tutte le prove sono state eseguite in triplo.

3.4 Determinazione spettrofotometrica 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 sodio tartrato (0.1 M (+)-acido tartarico/0.1 M sodio tartrato) a pH 3.3. Per ogni saggio sono stati utilizzati 100 µl di succo d'uva. 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 considerando solo la parte lineare della curva (Δ assorbanza vs. tempo) per il calcolo delle attività enzimatiche specifiche espresse come unità arbitraria (AU). 1 AU (AU/mg di proteina/min) corrisponde 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 3.3 e 25°C, durante la fase lineare della reazione. Tutte le prove sono state eseguite in triplo, utilizzando la medesima soluzione di estratto enzimatico.

3.5 Effetto dell'etanolo sull'attività polifenolossidasi

L'effetto di inibizione dell'etanolo sull'attività polifenolossidasi è stato testato, a differenti concentrazioni, a 25°C. Il catecolo è stato solubilizzato in tampone sodio-tartrato (0.1 M (+)-acido tartarico/0.1 M sodio tartrato) a pH 3.3 e le soluzioni finali avevano una concentrazione di etanolo pari all'8%, 10% e 12% (v/v) La miscela di reazione era costituita da 1.0 ml di catecolo 10 mM e 100 µl di succo d'uva. Tutte le prove sono state eseguite in triplo per ciascuna soluzione di etanolo.

3.6 Preparazione in sistema modello dei prodotti della reazione di Maillard (PRM)

I PRM sono stati preparati sulla base del metodo proposto da Roux *et al.* (2003). Sono stati utilizzati Fruttosio allo 0,1% e 0,05% (Sigma, St. Louis, MO, USA) e L-cisteina allo 0,1% e 0,05% (Sigma, St. Louis, MO, USA) per preparare una soluzione modello acquosa equimolare fruttosio/cisteina. Aliquote di 2 ml della soluzione modello sono state poste in provette (da 10 ml) sigillate con parafilm. I campioni sono stati quindi collocati in un bagnetto termostato a 90°C per un'ora. Le provette prelevate sono state immediatamente raffreddate in ghiaccio. Nelle successive prove di inibizione è stata impiegata soltanto la frazione solubile della miscela di reazione.

3.7 Inibizione su piastra dell'attività polifenolossidasi

Per l'efficacia di alcuni inibitori della PPO è stato utilizzato un test a gel diffusione su piastra Petri (Zocca *et al.*, 2008). Il gel è stato ottenuto usando agarosio (Amersham Biosciences) al 2% (p/v) sciolto con forno a microonde in tampone McIlvaine a pH 5.5. Successivamente la soluzione è stata raffreddata fino a raggiungere la temperatura di 70°C e quindi addizionata del substrato, L-DOPA 10 mM. In ogni piastra Petri sono stati quindi trasferiti 20 ml della soluzione e si è attesa la solidificazione a temperatura ambiente. Sul gel si sono ricavati, tramite apposito strumento, dei pozzetti del Ø di 3 mm in modo che la loro capienza in volume fosse all'incirca di 20 µl. Il succo d'uva è stato caricato nei pozzetti attraverso microsiringa.

La capacità di inibizione è stata verificata su succo fresco di Garganega attraverso piastre Petri con il metodo proposto da Zocca *et al.* (2008). L'effetto di inibizione del magnesio-L-ascorbil-2-fosfato, arbutina, acido Kojico (Prodotti Gianni, Milano, Italia), L-cisteina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e prodotti della reazione di Maillard è stato testato per ogni inibitore a concentrazioni 0.05% e 0.1%. Ciascun inibitore è stato solubilizzato in acqua distillata. La miscela di reazione caricata nel pozzetto era costituita da 10 µl di succo e 10 µl della soluzione di inibitore. L'entità di inibizione è stata valutata visivamente attraverso il confronto dell'area imbrunita con il pozzetto di verifica ("bianco") in

cui sono stati caricati 10 µl di succo e 10 µl di acqua distillata. Nelle piastre è stato valutato l'andamento dell'imbrunimento enzimatico fino ad un tempo di incubazione di 2.45 h a 25°C. L'immagine della piastra è stata acquisita con una fotocamera digitale.

3.8 Elettroforesi su gel di poliacrilamide (PPO)

Le prove elettroforetiche sono state condotte utilizzando l'apparato Mini Protean II (BIO-RAD, Milano, Italia) con un gel di poliacrilamide al 12% e 8.5% (dimensioni del gel 8 × 6 × 0.1 cm) in condizioni non riducenti ad un voltaggio costante di 100 V. Il tampone di corsa elettroforetico era costituito da Tris 25 mM, glicina 192 mM con SDS. I campioni di succo d'uva sono stati centrifugati a 14000 rpm per 5 min e addizionati 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 circa 10 µg.

3.9 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. L'immagine del gel è stata poi acquisita con una fotocamera digitale.

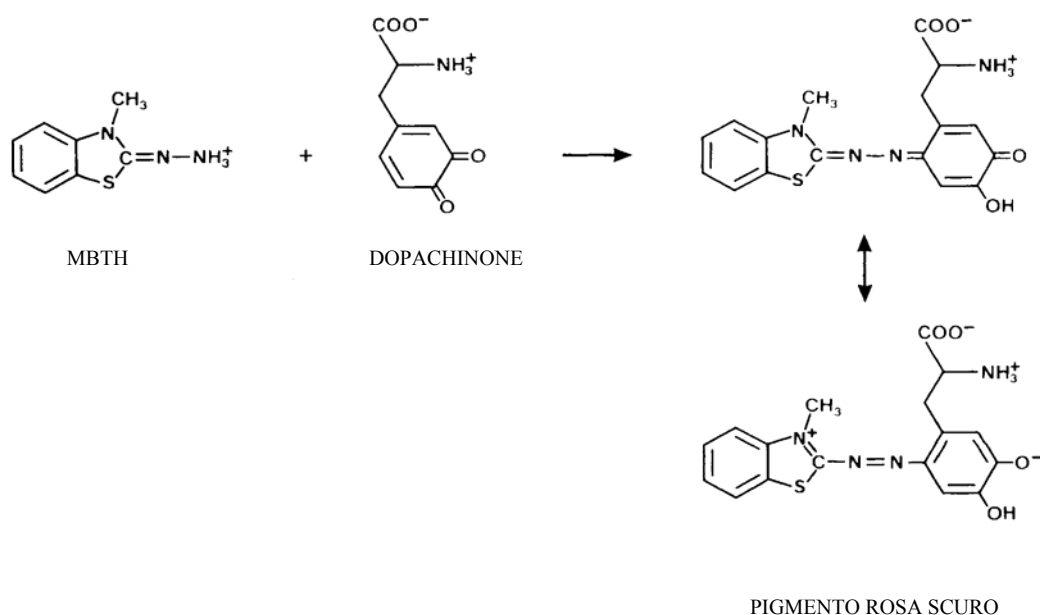


Figura 17. Reazione tra MBTH e DOPACHINONE (Winder & Harris, 1991).

3.10 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). 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) trasferendo la soluzione in piastre Petri (90 × 10 mm) nella quantità di 20 ml/piastra e lasciandola 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 20 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'attività 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.

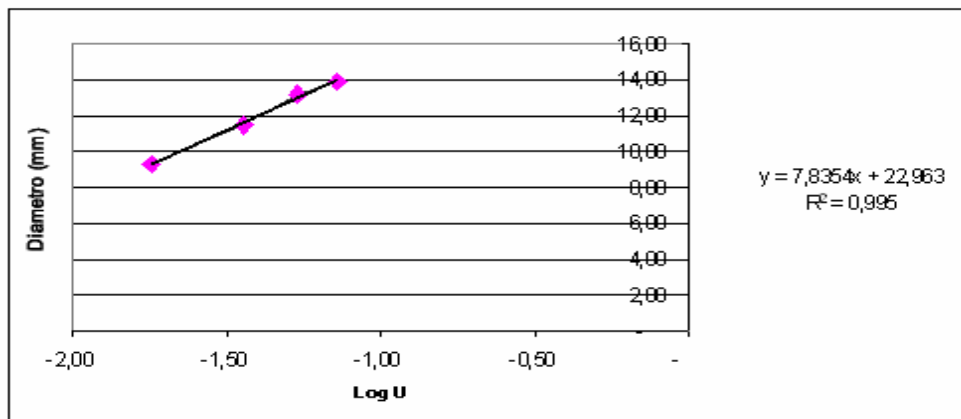


Figura 18. Retta di taratura ottenuta con diluizioni di PME commerciale (da buccia di arancia) per il calcolo dell'attività PME dell'uva. Il diametro degli aloni, dato dalla demetilazione della pectina, è stato riferito al Log delle unità note dell'enzima commerciale.

3.11 Analisi statistica

Ogni risultato è stato ottenuto dalla media di almeno tre ripetizioni su cui è stata calcolata la deviazione standard. I grafici sono stati realizzati con il software Excel (Microsoft, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Misura spettrofotometrica dell'attività PPO

L'attività della PPO è la responsabile della reazione di imbrunimento enzimatico del succo e del mosto d'uva, quando vi sia la presenza dell'ossigeno che funziona da co-fattore nella reazione di ossidazione. Particolarmente soggette a questo problema sono le varietà d'uva a bacca bianca, dove la PPO oltre ad alterare di colore il succo, causa una diminuzione della qualità organolettica e nutrizionale del prodotto (Mayer & Harel, 1991).

La misura dell'attività PPO è avvenuta in condizioni chimico-fisiche che normalmente si possono verificare durante il processo di vinificazione. Infatti molti risultati riportati dalla bibliografia adottano parametri di reazione che si discostano ampiamente da quelli presenti nei risultati reali. Per la determinazione quantitativa dell'attività PPO è stata utilizzato un test spettrofotometrico adottando come substrato il *p*-cresolo e il catecolo. La scelta di impiegare, come matrice per la solubilizzazione dei substrati, il tampone sodio-tartrato pH 3.3 non è stata casuale. L'acido tartarico è l'acido organico più rappresentativo del succo d'uva e il valore di pH 3.3 è il risultato delle medie dei valori di pH dei succhi analizzati. Un primo importante risultato, dal punto di vista operativo in laboratorio, è dato dal fatto che l'attività PPO dell'uva Garganega determinata a pH 3.3 era sensibilmente differente in funzione del tampone utilizzato. Questo spiega come sia importante l'impiego di una soluzione tampone rispetto ad un'altra per la valutazione di un'attività enzimatica *in vitro* pur mantenendo il medesimo valore di pH. Oltre al tampone sodio-tartrato, sono stati utilizzati due matrici quali citrato-fosfato e sodio-citrato a pH 3.3 ma per entrambe sono stati ottenuti dei valori di attività PPO sensibilmente più bassi (Allegati **Tab 1**), quindi si può dedurre che questi sistemi tampone funzionino da inibitori dell'attività PPO.

La temperatura alla quale sono state effettuate le misurazioni era di 25°C, una condizione che si può facilmente verificare in cantina, dove nelle piccole aziende, l'utilizzo della criomacerazione non è ancora largamente diffusa.

L'enzima delle varietà analizzate ha mostrato un'elevata affinità per i diidrossifenoli rispetto ai monoidrossifenoli dove l'attività cresolasica era pari a circa lo 0,4% dell'attività catecolasica in Garganega con tampone sodio-tartrato pH 3.3 (Allegati **Tab 1**).

Nel calcolo dell'attività catecolasica sono state trovate delle differenze intra- ed intervarietali, riscontrabili sia nell'espressione dell'attività per unità di volume (100 µl) che nel caso del calcolo dell'attività specifica riferita a µg di proteina. Quest'ultimo modo di esprimere l'attività è sicuramente quello da preferire, perché rende direttamente comparabili i diversi valori determinati. A parità di proteina analizzata le varietà Moscato e Cortese erano quelle che possedevano una maggiore capacità di imbrunimento, mentre le varietà Garganega, Trebbiano e Durella presentavano attività più basse (Allegati **Tab 2** e **Fig 1 e 2**). Se da un certo punto di vista, le differenze intervarietali sono facilmente riscontrabili (Traverso-Rueda e Singleton, 1973), meno scontate risultano quelle intravarietalmente dimostrando come i fattori genetici, fenologici e agronomici possono influenzare significativamente l'attività.

Effetto dell'etanolo sull'attività catecolasica

L'attività PPO è influenzata e inibita dalla produzione di etanolo durante la fermentazione alcolica (Cheynier *et al.*, 1989; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Spagna *et al.*, 2000). Sono state prese in considerazione tre diverse concentrazioni di etanolo ed è stato valutato l'effetto inibitorio dell'alcol sull'attività della PPO. Le percentuali di etanolo impiegate erano comprese tra l'8 ÷ 12%, e coprono un range di valori che si può comunemente riscontrare nella maggior parte dei vini bianchi ottenuti dalla vinificazione delle varietà analizzate.

La concentrazione più bassa di etanolo, pari all'8%, inibiva l'attività della PPO in una percentuale compresa tra il 48 ÷ 59% (Allegati **Fig. 3** e **Tab 3**).

Nel caso della concentrazione maggiore di etanolo (12%) la percentuale di inibizione si attesta tra i 60 ÷ 69%, questo significa che l'azione esercitata dall'alcol non è in grado di inibire completamente l'enzima PPO ed è necessario intervenire in fase di pre-fermentazione con l'aggiunta di additivi quali SO₂ o impiegare tecnologie come l'iperossigenazione del succo (Mayer & Harel,

1991). L'etanolo si dimostra un inibitore efficace della PPO, ma per ottenere un'elevata percentuale di inibizione è necessario raggiungere, nel nostro caso, una gradazione alcolica del 12%. Comunque l'inibizione non è completa e l'attività residua rappresenta un punto interrogativo per la stabilità del prodotto. Da questi risultati si può quindi concludere che l'imbrunimento enzimatico non riguarda solamente la fase di estrazione del succo d'uva, ma è un problema che si può verificare anche durante la fase di fermentazione.

Test di inibizione chimica su piastra dell'attività catecololica

Per verificare l'efficacia di alcuni inibitori alternativi all' SO_2 sono stati effettuati dei test su piastre Petri. Sono stati scelti 4 inibitori dell'enzima PPO quali, il magnesio L-ascorbil-2-fosfato (MAF, derivato della vitamina C), l'arbutina (AR), l'acido kojico (AK) l'L-cisteina (CIS) e prodotti della reazione di Maillard (PRM) (Kameyama *et al.*, 1996; Hori *et al.*, 2004, Chen *et al.*, 1991a, 1991b; Richard-Forget *et al.*, 1992; Roux *et al.*, 2003). Per le diverse prove sono state utilizzate concentrazioni degli inibitori pari allo 0.05% e 0.1%. A 10 μl di succo d'uva Garganega (18.20 μg proteina/100 μl di succo d'uva) sono stati aggiunti 10 μl delle soluzioni degli inibitori sopra indicati. Il MAF e l'AR non davano alle concentrazioni impiegate nessun effetto di inibizione visibile su piastra (Allegati **Fig. 4a**). L'AK invece, alle medesime concentrazioni, induceva una fase *lag* nell'attività enzimatica, più evidente alla concentrazione dello 0.1%. L'AK non ha quindi la medesima efficacia di inibizione verso la PPO di uva che invece manifesta nei confronti della tirosinasi fungina, come riportato in bibliografia (Chen *et al.*, 1991a).

Nella **Fig. 4c** (Allegati) dopo 1 h di incubazione vi era la comparsa di un alone di imbrunimento nei pozzetti in presenza di cisteina allo 0.05% e 0.1% . Il diametro è comunque inferiore rispetto al controllo (Garg) in assenza di inibitore e si notava un'attività inversamente proporzionale all'aumentare della dose di inibitore.

Utilizzando invece i PRM (Allegati **Fig 4b**) si è avuta una completa inibizione della PPO solo con concentrazioni di cisteina e fruttosio pari allo 0.1%, mentre alla concentrazione inferiore (0.05%) si è verificata una fase *lag* come nel caso

dell'AK. A differenza della cisteina, i PRM alla concentrazione dello 0.1% dopo 1 h di incubazione non permettevano un imbrunimento del substrato.

Elettroforesi della PPO

Gli zimogrammi in SDS-PAGE (8.5% e 12%) del succo in condizioni non riducenti, hanno permesso di rilevare nelle diverse varietà, l'attività delle forme solubili di PPO, estraibili per semplice pressatura degli acini. In entrambi i gels a differente concentrazione di poliacrilamide, ad esclusione della Garganega che presentava due isoforme, tutte le altre varietà erano caratterizzate da profilo elettroforetico molto simile costituito da una singola banda (Allegati **Fig. 5**). È comunque interessante notare come le bande possedevano intensità di colorazione differente. Quest'ultimo aspetto conferma i dati relativi all'analisi spettrofotometrica, dove a parità di concentrazione di proteina le varietà che avevano maggiore attività, erano le prime a comparire sul gel oltre a possedere una maggiore intensità di colore e spessore.

Misura su piastra dell'attività PME

L'attività PME è coinvolta nei fenomeni chimico-fisici connessi alle operazioni di chiarificazione ed estrazione del succo, di liquefazione e macerazione della polpa e della produzione di metanolo. Un'elevata attività PME causa una degradazione della pectina e contribuisce ad un abbassamento della viscosità, influenzando notevolmente la torbidità dei succhi. Quest'aspetto comporta una più facile rimozione tramite centrifugazione e/o (ultra)filtrazione del sedimento che si ottiene durante la produzione dei succhi di frutta. La PME inoltre influisce positivamente sulla resa di estrazione del succo dalla polpa e negativamente, essendone la principale responsabile, sulla produzione di metanolo nei mosti d'uva durante le fasi di fermentazione e macerazione. Un aspetto importante che lega la PME alla PPO è dato dal fatto che quando i fenoli vengono ossidati dalla PPO, dopo la fase di pressatura, essi tendono a polimerizzare in composti ad elevato peso molecolare capaci di inibire l'enzima PME (Pilnik & Voragen , 1991).

La maggiore attività PME è stata riscontrata nei campioni Moscato 1 e Moscato 2 mentre i succhi che possedevano l'attività più bassa, a parità di proteina caricata, erano i campioni Moscato 3 e Durella (Allegati **Fig. 6, 7** e **Tab 4**). Come nel caso della PPO, anche per la PME sono state evidenziate delle differenze sia a livello intra- (Moscato e Cortese) che intervarietale, con l'eccezione della Garganega e del Trebbiano che mostravano attività PME simile.

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti permettono di trarre alcune conclusioni anche di interesse generale.

La scelta delle condizioni di reazione in cui testare le attività enzimatiche di importanza tecnologica può creare degli equivoci ed essere responsabile delle difficoltà di trasferimento dei risultati, dal laboratorio alla realtà operativa. In questo caso è stato dimostrato che l'utilizzo di uno specifico tampone di reazione determina valori sensibilmente differenti nell'attività polifenolossidasi dell'uva Garganega.

In base a questi presupposti è consigliabile puntare su sistemi modello simili alle condizioni operative e in questo caso la scelta di lavorare su succo d'uva e di utilizzare il tampone sodio-tartrato va in questa direzione. Non si può dimenticare che una sottostima dell'attività polifenolossidasi può essere pericolosa. L'enzima risulta strettamente dipendente dalla varietà ed è diversamente inibito dalla presenza di etanolo.

In quest'ottica la PPO può essere considerata non solo "l'enzima del mosto" ma anche quello "del prodotto fermentato", con i rischi per la stabilità che ciò può comportare. A questo proposito, vitigni come Durella e Moscato, ambedue destinati alla spumantizzazione, richiederebbero condizioni di lavorazione ad hoc per il controllo dell'attività PPO sul prodotto finito.

Un'interpretazione pragmatica di questo risultato ha conseguenze pratiche importanti nella scelta degli additivi da aggiungere e della dose da utilizzare che dovrebbe essere correlata alla varietà, anche nella prospettiva di una sostituzione dei solfiti.

Per quanto riguarda la PME, anche in questo caso, la stretta dipendenza tra attività enzimatica e varietà deve guidare gli interventi tecnologici. L'aggiunta di preparati pectinolitici potrebbe infatti essere addirittura dannosa elevando la concentrazione di metanolo e peggiorando la torbidità dei mosti ottenuti da vitigni che ne sono particolarmente dotati.

In sintesi, i risultati ottenuti ci spingono sempre di più a sostenere un'enologia "di precisione".

ALLEGATI

GARGANEGA	Citrato-Fosfato pH 3.3	Sodio-Citrato pH 3.3	Sodio-Tartrato pH 3.3
	AU/min/100µl	AU/min/100µl	AU/min/100µl
Attività catecolasica	14,50 ± 0,75	27,90 ± 7,92	39,65 ± 0,49
Attività cresolasica	0,135 ± 0,092	0,06 ± 0	0,15 ± 0,071

Tabella 1. Specificità di substrato dell'enzima PPO in uve Garganega, relativa all'attività catecolasica e cresolasica, in funzione di 3 tamponi diversi al medesimo valore di pH (3.3).

1 AU = 0.001 Δ abs/min.

Varietà	Proteina totale (µg proteina/100µl succo)	AU/min/100µl	AU/min/µg proteina
Cortese 1	17,15 ± 0,41	45,45 ± 0,64	2,65
Cortese 2	12,65 ± 0,46	29,25 ± 0,64	2,31
Moscato 1	14,23 ± 0,39	36,00 ± 0,85	2,53
Moscato 2	24,23 ± 0,55	68,95 ± 0,64	2,84
Moscato 3	25,48 ± 1,35	86,20 ± 0,28	3,38
Moscato 4	22,26 ± 0,39	56,60 ± 2,12	2,54
Garganega	18,20 ± 0,58	39,65 ± 0,49	2,18
Trebbiano	22,87 ± 0,38	32,73 ± 0,72	1,43
Durella	22,65 ± 0,25	8,00 ± 0,57	0,35

Tabella 2. Proteina totale (µg di proteina/100 µl di succo) e attività catecolasica (determinata su catecolo 10 mM) in 100 µl e per µg di proteina (attività specifica) dei 9 campioni d'uva presi in esame.

1 AU = 0.001 Δ abs/min.

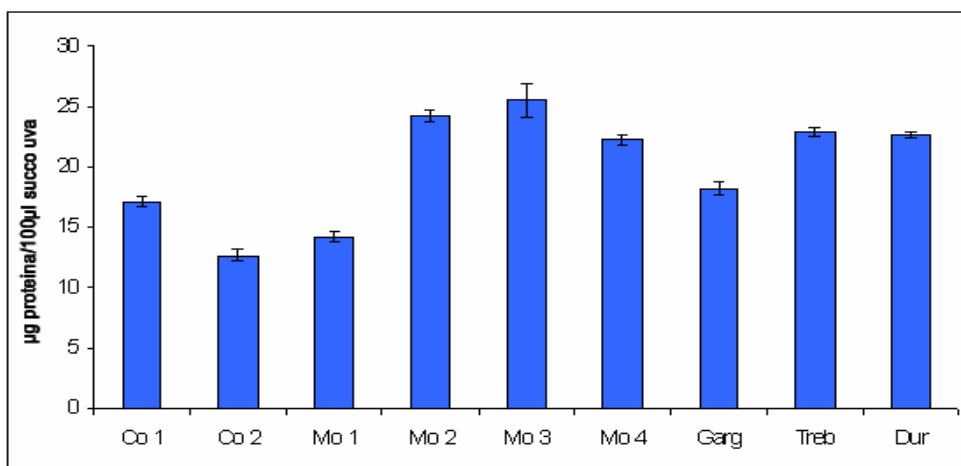


Figura 1. Concentrazione in proteina ($\mu\text{g proteina}/100 \mu\text{l}$ di succo) dei succhi d'uva analizzati: Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur).

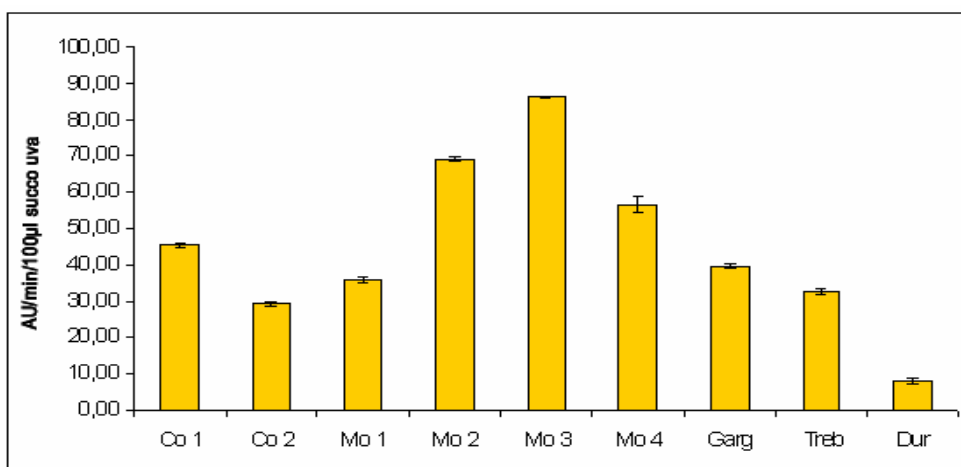


Figura 2. Attività catecolasica ($\text{AU}/\text{min}/100\mu\text{l}$ di succo) dei succhi d'uva analizzati: Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur). Il substrato era rappresentato da catecolo 10 mM.

1 AU = 0.001 Δ abs/min.

Varietà	Attività catecolasica 8% Etanolo		Attività catecolasica 10% Etanolo		Attività Catecolasica 12% Etanolo	
	Attività residua/100µl (AU/min/100µl)	% inibizione	Attività residua/100µl (AU/min/100µl)	% inibizione	Attività residua/100µl (AU/min/100µl)	% inibizione
Cortese 1	20,30 ± 0,14	55,34	18,35 ± 0,78	59,80	16,00 ± 1,27	64,80
Cortese 2	14,60 ± 0,14	50,09	11,70 ± 0,71	58,39	10,70 ± 0,00	63,42
Moscato 1	14,75 ± 0,49	54,93	13,35 ± 0,49	62,39	11,70 ± 0,00	67,04
Moscato 2	32,95 ± 2,05	52,21	27,15 ± 0,35	60,62	24,15 ± 1,48	64,97
Moscato 3	41,85 ± 0,92	51,45	35,95 ± 0,49	58,29	30,60 ± 2,23	64,50
Moscato 4	28,90 ± 0,14	48,94	24,10 ± 0,71	57,42	22,35 ± 0,21	60,51
Garganega	16,16 ± 0,64	59,39	14,85 ± 0,78	62,55	13,20 ± 1,13	66,71
Trebbiano	13,60 ± 0,40	58,45	12,55 ± 0,49	61,66	10,20 ± 0,40	68,84
Durella	4,15 ± 0,21	48,13	3,00 ± 0,42	62,50	2,65 ± 0,78	66,88

Tabella 3. Inibizione percentuale dell'attività PPO (su catecolo 10 mM) in funzione di concentrazioni crescenti di etanolo.

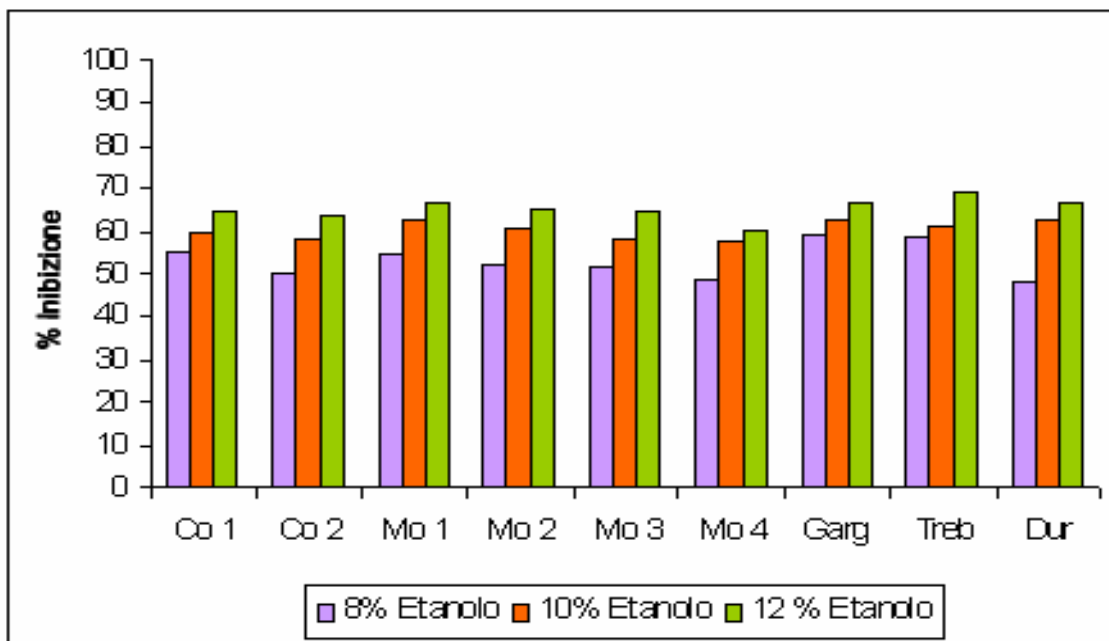


Figura 3. Inibizione percentuale dell'attività PPO (su catecolo 10 mM) in funzione di concentrazioni crescenti di etanolo. Le uve testate sono state: Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur).

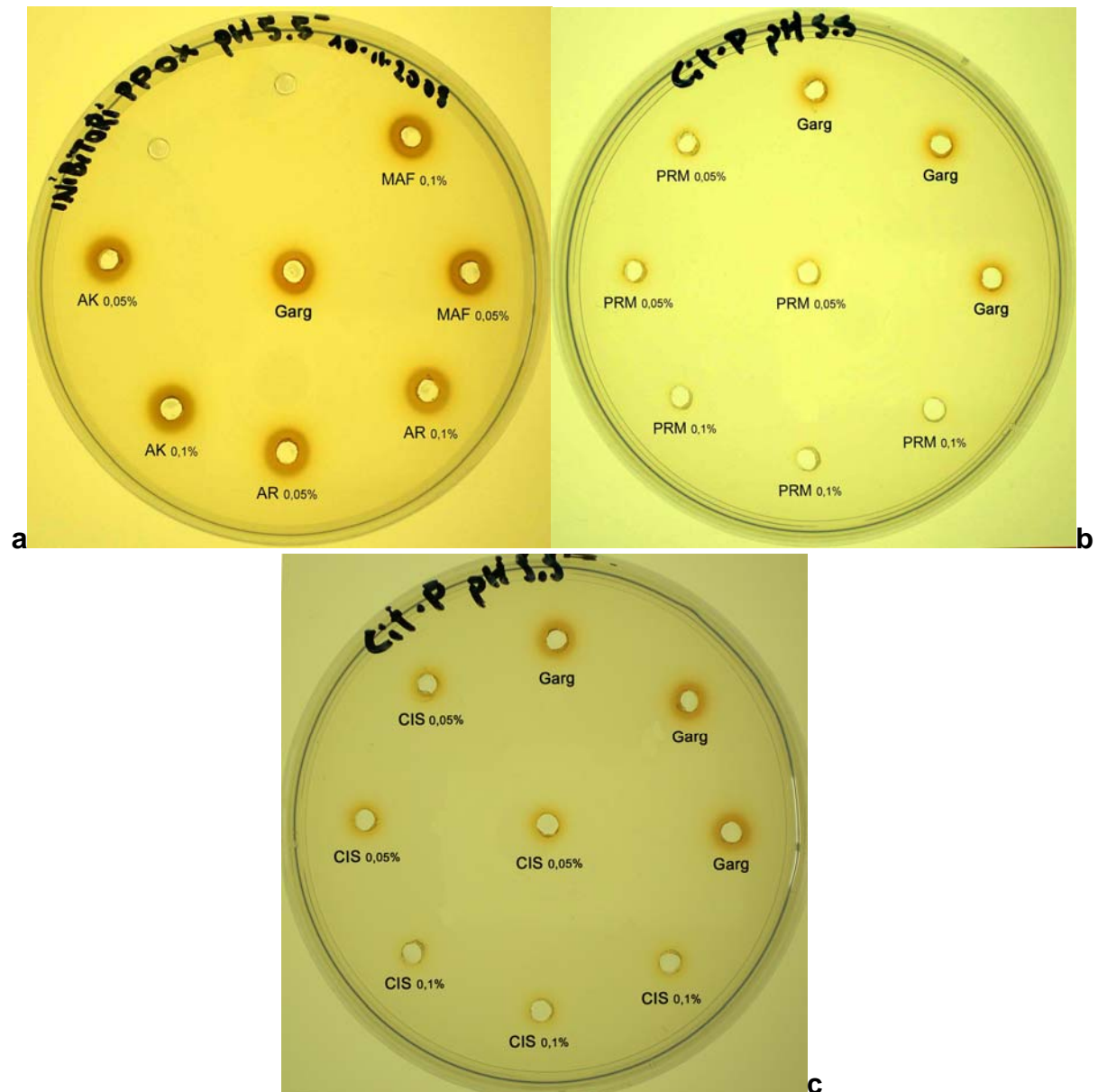


Figura 4. Inibizione su piastra dell'attività PPO di uva Garganega con due livelli di concentrazione degli inibitori: **(a)** magnesio-L-ascorbil-2-fosfato (MAF), arbutina (AR), acido kojico (AK); **(b)** prodotti della reazione di Maillard (PRM); **(c)** cisteina (CIS).

Ogni pozzetto è stato caricato con 10 µl di inibitore e 10 µl di succo d'uva.

Come controllo (Garg) è stato utilizzato acqua distillata miscelata al succo d'uva alle medesime concentrazioni del test.

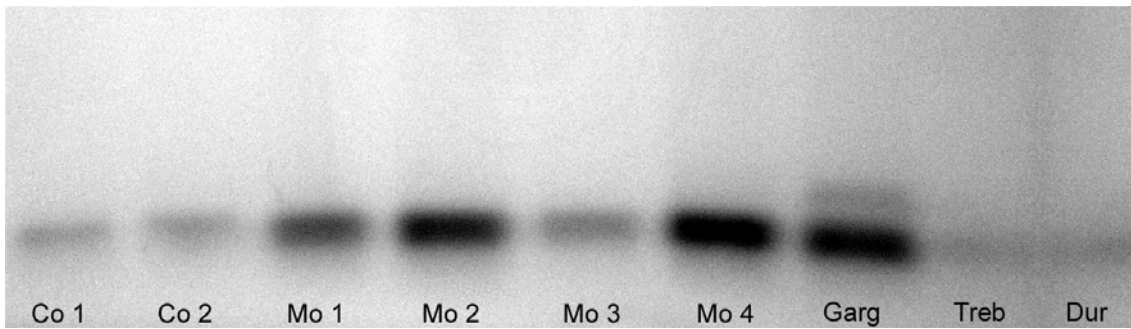


Figura 5. SDS-PAGE (8.5%, 100V, $\approx 10\mu\text{g}$ di proteina per pozzetto) dei campioni esaminati: Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur).

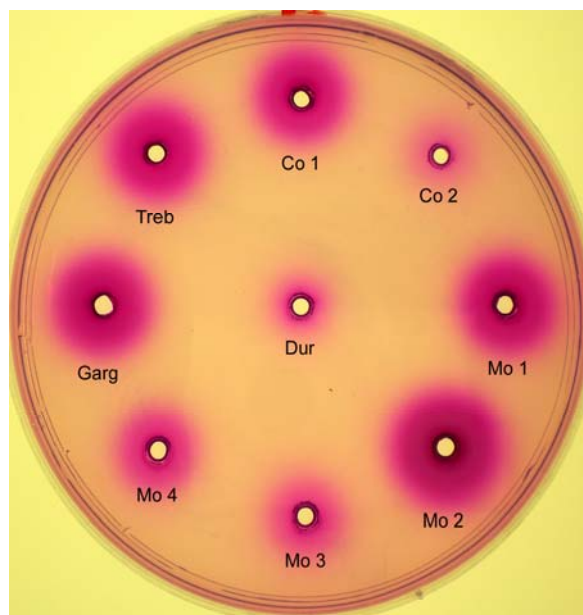


Figura 6. Saggio su piastra dell'attività PME di uve Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur).

Varietà	Attività Specifica (AU enzima/ μ g proteina)	\varnothing Medio (mm)
Cortese 1	0,0053 \pm 0,0010	8,25 \pm 0,67
Cortese 2	0,0021 \pm 0,0005	5,13 \pm 0,75
Moscato 1	0,0057 \pm 0,0011	8,88 \pm 0,70
Moscato 2	0,0054 \pm 0,0005	10,55 \pm 0,29
Moscato 3	0,0010 \pm 0,0003	4,95 \pm 0,97
Moscato 4	0,0029 \pm 0,0005	8,12 \pm 0,56
Garganega	0,0033 \pm 0,0008	7,88 \pm 0,83
Trebbiano	0,0026 \pm 0,0003	7,82 \pm 0,47
Durella	0,0008 \pm 0,0002	3,82 \pm 0,98

Tabella 4. Attività specifica della PME espressa come AU di enzima per μ g di proteina. L'attività è stata determinata su piastra ed espressa attraverso la misura del diametro dell'alone formato.
1 AU = 1.0 μ eq di acido pectico/min.

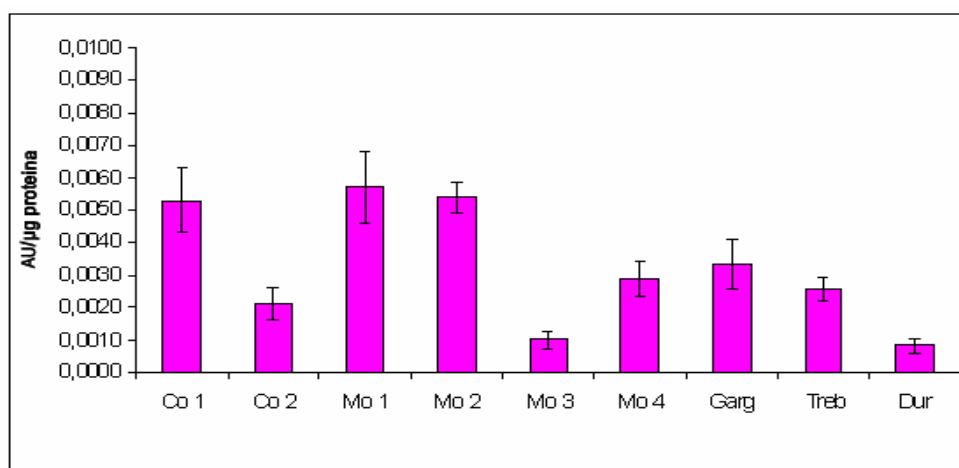


Figura 7. Attività specifica (AU/ μ g proteina) dell'enzima PME determinata nei campioni d'uva: Cortese 1 (Co 1), Cortese 2 (Co 2), Moscato 1 (Mo 1), Moscato 2 (Mo 2), Moscato 3 (Mo 3), Moscato 4 (Mo 4), Garganega (Garg), Trebbiano (Treb) e Durella (Dur).
1 AU = 1.0 μ eq di acido pectico/min.

7. BIBLIOGRAFIA

Balestrieri C., Servillo L., Quagliolo L., (2003), Inibitore della pectina metilesterasi nella preparazione dei succhi di frutta e derivati, It. Patent n° RM2003A000346.

Balestrieri C., Servillo L., Quagliolo 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.

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.

Billaud C., Roux E., Maraschin C., Brun-Mérimee S., Nicolas J., (2003), Inhibitory effect of unheated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model system on polyphenoloxidase from apple. 1. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods, *Food Chem.*, **81**: 35-50.

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.

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.

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.

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.

Chen J.S., Wei C., Marshall M.R., (1991b), Innhibition machanism of Kojic acid on polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **39** (11): 1897-1901.

Chen J.S., Wei C., Rolle R.S., Otwell W.S., Balaben M.O., Marshall M.R., (1991a), Inhibitory effect of Kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases, *J. Agric. Food Chem.*, **39** (8): 1396-1401.

Cheynier V., Basire N., Rigaud J., (1989), Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **37**: 1069-1071.

Cheynier V., Rigaud J., Souquet J., Duprat F., Moutounet M., (1990), Must browning in relation to the behaviour of phenolic compound during oxidation, *Amer. J. Enol. Viticult.*, **41**: 346-349.

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

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

Curto E.V., Kwong C., Hermersdörfer H., Glatt H., Santis C., Virador V., Hearing V., Dooley T.P., (1999), Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparison of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors, *Biochem. Pharmacology*, **57**: 663-672.

Decker H., Dillinger R., Tucek F., (2000), How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**: 1591-1595.

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 pectinmethyl-esterase activity, *Anal. Biochem.*, **264**: 149-157.

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

EFSA, (2006), Opinion of the scientific panel on food additives, flavouring, processing aids and materials in contact with food related to: Use of L-cysteine in food intended for infants and young children, *The EFSA Journal*, **390**: 1-7.

Es-Safi N.E., Cheynier V., Moutounet M., (2003), Implications of phenolic reactions in food organoleptic properties, *J. Food Comp. Anal.*, **16**: 535-553.

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.

- 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.
- Friedman M., Molnar-Perl I., (1990), Inhibition of browning by sulfur amino acids. 1. Heated aminoacid-glucose systems, *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 1642-1647.
- Funayama M., Arakawa R., Yamamoto R., Nishino T., Shin M., Murao S., (1995), Effects of α -arbutin on activity of tyrosinase from mushroom and mouse melanoma, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 143-144.
- Goodwin C. O., Morris, J. R. (1991), Effect of ultrafiltration on wine quality and browning, *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**: 347-353.
- Guyer R. B., Miller W. B., Bissett O. W., Velduis M. K., (1956), Stability of frozen concentrated orange juice, *Food Technol.*, **10**: 570-574.
- Harel E., Mayer A.M., Shain Y., (1964), Cathecol oxidase from apples, their properties, subcellular location and inhibition, *Physiol. Plant.*, **17**: 921-930.
- Hori I., Nihei K., Kubo I., (2004), Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin, *Phytother. Res.*, **18**: 475-479.
- 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.
- Kameyama K., Sakai C., Kondoh S., Yonemoto K., Nishiyama S., Tagawa M. Murata T., (1996), Inhibitory effect of magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (VC-PMG) on melanogenesis in vitro and in vivo, *J. Am. Ac. Dermatol.*, **34**: 29-33.

Kertersz 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.

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

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.

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.

Lee C.Y., Jaworski A:W:, (1988), Phenolic and browning potential of white grape grown in New York, *Am J. Enol. Vitic.*, **39**: 337-34.

Lerch K., (1995), Tyrosinase: Molecular and active-site structure; in *Enzymatic Browning and Its Prevention* (pp. 64-80), ACS Symposium series 600, American chemical society, Washiton DC.

Li H., Guo A., Wang H., (2008), Mechanisms of oxidative browning of wine, *Food Chem.*, **108**: 1-13.

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.

- Markovic O., Kohn R., (1984), Mode of pectin deesterification by *Trichoderma reesei* pectinesterase, *Experientia*, **40**: 842-843.
- 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 beowning, *Trends Fodd Sci. Techol.*, **6**: 195-200.
- 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.
- 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.
- Nicolas J. J., Richard-Forget F. C., Goupy P. M., Amiot M. J. & Aubert S. (1994) Enzimatic 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.

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

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.

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

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., (2006), *Handbook of enology*, The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol. 2), Chichester, England: John Wiley and Sons Ltd.

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.

Rigaud J., Cheynier V., Souquet J. M., Moutounet M., (1991), Influence of must composition on phenolic oxidation Kinetics, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **57**: 55-63.

Robards K., Prenzler P. D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W., (1999), Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chem.*, **66**: 401-436.

Ros J.R., Rodriguez-López J.N., Garcia-Cànovas F., (1993), Effect of L-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase, *Biochem. J.*, **295**: 309-312.

Roux E., Billaud C., Maraschin C., Brun-Mérimee S., Nicolas J., (2003), Inhibitory effect of unheated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model system on polyphenoloxidase from apple. 2. Kinetic study and mechanism of inhibition, *Food Chem.*, **81**: 51-60.

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

Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N., (2003), Mushroom tyrosinase: recent prospect, *J. Agric. Food Chemistry*, **51**: 2837-2853.

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.

Silva Ferreira A. C., Guedes de Pinho P., Rodrigues P., Hogg T., (2002), Kinetics of oxidative degradation of white wine and how they are affected by selected technological parameters, *J. Agr. Food Chem*, **50**: 5919-5924.

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.

Singleton V. L., Salgues M., Zaya J., Trousdale E., (1985), Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine, *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 50-56.

Singleton V.L., Salgues M., Zaya J., Trousdale E, (1985), Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must, *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 50-56.

Sioumis N., Kallitharaka S., Tsoutsouras E., Makris D. P., Kefalas P., (2005), Browning development in white wines: Dependence on compositional parameters and impact on antioxidant characteristics, *European Food Research and technology*, **220**: 326-330.

Solomon E.I, Baldwin M.J., Lowery M:D, (1992), Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity, *Chem. Rev.*, **92**: 521-542.

Spagna G., Barbagallo R. N., Pifferi P. G., (2000), Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning, *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 4619-4627.

Sugimoto K., Nishimura T., Kuriki T., (2007), Development of α -arbutin: Production at industrial scale and application for a skin-lightening cosmetic ingredient, *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **19**: 235-246.

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.

Toivonen P.M.A., Brummell D.A., Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetable, (2008), *Postharvest Biol. Technol.*, **48**: 1-14.

Tomita K., Fukuda M., Kawasaki K., (1990), Mechanism of arbutin inhibitory effect on melanogenesis and effect on the human skin with cosmetic use, *Fragrance J.*, **6**: 72-77.

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

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

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.

Valero E., Varon R., Garcia- Carmona F., (1988), Characterization of polyphenol oxidase from Airen grape, *J. Food Sci.*, **53**: 1482-1485.

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

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. & 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.

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.

Wilcox D.E., Porras A.G., Hwang Y.T., (1985), Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**: 4015-4027.

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

Yoruk R., Marshall M.R., (2003), Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review, *J. Food Biochem.*, **27**: 361-422.

Zhou P., Smith N.L., Lee C:Y:, (1993), Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase, *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 532-536.

Zocca F., Lomolino G., Lante A., (2008), 3,4-Dihydroxyphenylalanine gel diffusion assay for polyphenoloxidase quantification, *Anal. Biochem*, **383** (2): 335-336.

RINGRAZIAMENTI

Grazie alla mia famiglia per aver sempre creduto in me.

Grazie di cuore alla Prof.ssa Anna Lante per la grande disponibilità e professionalità dimostratami nella stesura della tesi.

Grazie, infinitamente grazie a Federico per l'inesauribile aiuto, per la pazienza e la simpatia.

Grazie a tutta la squadra del laboratorio di tecnologie alimentari.

Grazie ai compagni di tesi Luca, Marco e Matteo per tutti i bei momenti passati in laboratorio.

Grazie ai miei compagni di studio Alessandro, Gabriele, Luca, Luigi e Maria per l'amicizia e per avere sempre trovato una risposta alle mie domande.

Grazie ai "tosi de Sosan" e in particolare a Nicola per la sua insostituibile Amicizia.

Infine, perché le persone speciali si ricordano alla fine, voglio esprimere un immenso GRAZIE alla mia Anna.