



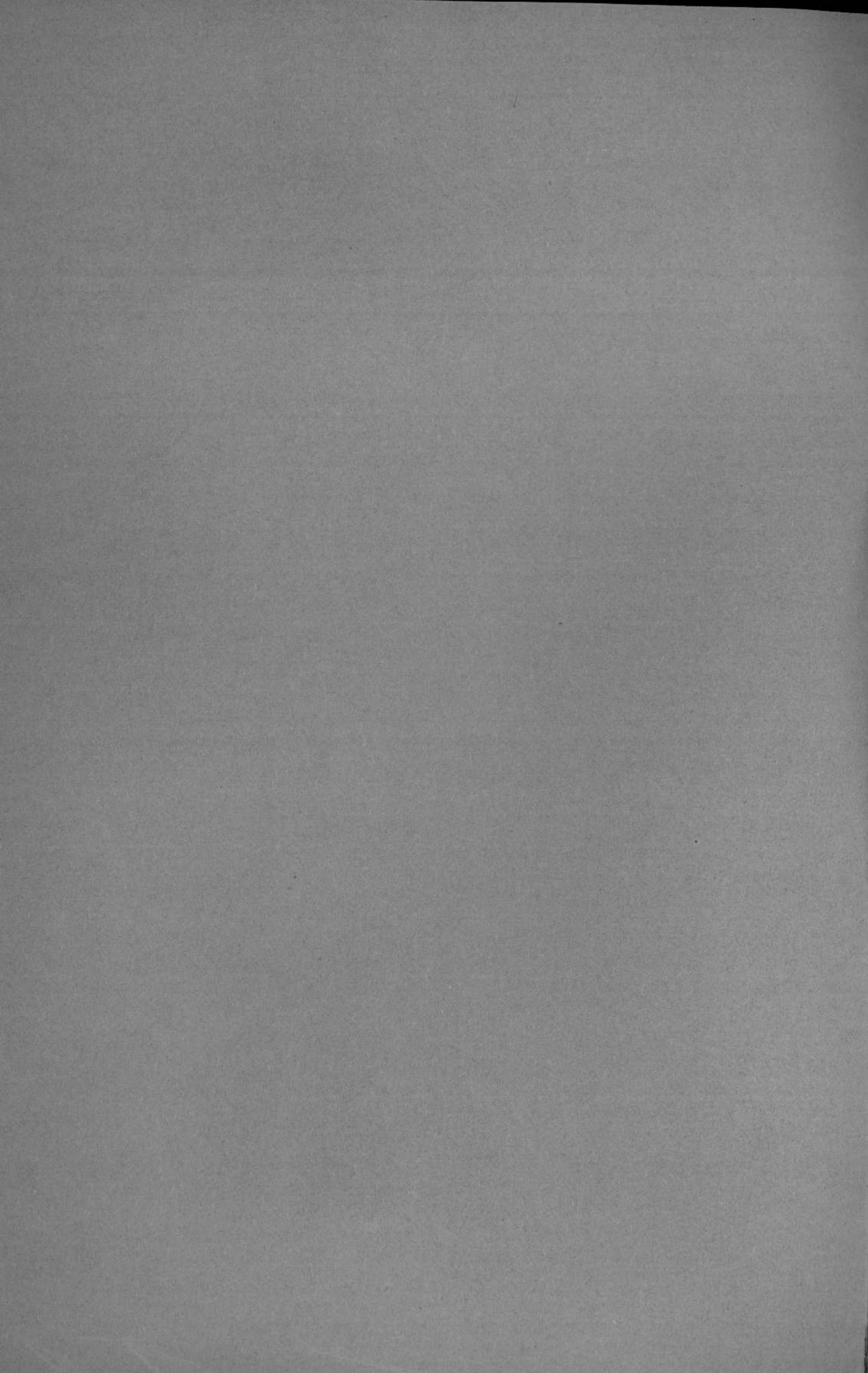
S. BAGLIONI, L. CASALE e C. TARANTOLA

L'ATTIVITÀ PROTEOLITICA DEL SUCCO D'UVA.

Estratto da
IL PROBLEMA ALIMENTARE
Anno I (Serie II), Fasc. I
Settembre-Ottobre 1937-XV



Mar
B
53
105



S. BAGLIONI - L. CASALE - C. TARANTOLA

L'ATTIVITÀ PROTEOLITICA DEL SUCCO D'UVA

I.

CONSIDERAZIONI GENERALI

di S. BAGLIONI

Del succo d'uva dal punto di vista alimentare si è finora prevalentemente (per non dire soltanto) considerato il contenuto dei principi alimentari, dimostrabili e identificabili coll'applicazione dei metodi classici dell'analisi chimica, giungendo a risultati molto importanti, specialmente nei riguardi del ricco contenuto dei migliori glicidi e dei sali. Ben poco è stato fatto nei riguardi del contenuto in agenti biochimici (come io soglio chiamare con tal nome collettivo i principi identificabili con metodi più strettamente biologici, ossia gli enzimi, le vitamine, gli ormoni e gli anticorpi e affini), che pure non essendo aggredibili con metodi della stessa apparente esattezza di quelli chimici, sono forse di uguale se pure non maggiore importanza biologica.

Se si prescinde infatti da alcune ricerche sperimentali (alle quali hanno pure contribuito e stanno contribuendo valorosi allievi della mia scuola) sull'eventuale contenuto vitaminico e di

poche altre sulla presenza di alcuni enzimi (delle quali è cenno nelle seguenti note dei miei collaboratori), nessuna altra ricerca è stata sinora eseguita (per quanto mi risulta dalla letteratura) sull'importante problema.

Da quando (ed è ormai qualche anno) che sotto gli auspici del dicastero dell'agricoltura e coll'appoggio della federazione vitivinicola mi sto occupando sperimentalmente del vasto e importante campo dei prodotti dell'uva nell'alimentazione umana, uno degli argomenti preferito è stato quello della ricerca degli enzimi del succo d'uva e del suo comune derivato, il vino. Nell'esecuzione pratica del programma il merito spetta al camerata ed amico L. CASALE, che facendo tesoro della sua competenza ed abilità chimica ha saputo nel suo Istituto affrontare e risolvere felicemente il problema della identificazione di particolari enzimi proteolitici nel succo di uva. Egli e il suo allievo e collaboratore C. TARANTOLA, al quale è stato affidato il lavoro analitico, riferiscono nelle due seguenti note i risultati ottenuti; il mio compito si limita qui ad alcuni cenni introduttivi e conclusivi sulla importanza, dal punto di vista alimentare, della presenza di detti

enzimi e sul loro probabile significato biologico generale.

L'interesse dei fisiologi e dei medici sulla presenza di enzimi (oltre che nei succhi digerenti) negli alimenti liquidi e nei cibi ingeriti allo stato di freschezza, senza che abbiano cioè subito le alterazioni prodotte dalla cottura, e quindi la distruzione degli agenti biochimici termolabili (quali sono gli enzimi e alcune vitamine), sorse e si è andato sempre più diffondendo da quando gli studiosi dell'alimentazione dei lattanti dimostrarono che nel latte fresco, così come è secreto dalla glandola mammaria, esistono ed hanno una predominante importanza sui processi di digestione e di assorbimento dei neonati e degli infanti, i diversi agenti biochimici che sono distrutti col riscaldamento e coll'ebollizione, fatta subire al latte allo scopo igienico e profilattico della sterilizzazione batterica.

Tra questi agenti biochimici termolabili figurano, oltre le vitamine, i vari enzimi, che se sono inalterati possono coadiuvare nello stomaco e nell'intestino del lattante ai processi digestivi, senza i quali non può avvenire l'assorbimento fisiologico specialmente delle proteine del latte.

Di non minore importanza nell'alimentazione degli adulti, specialmente in condizioni patologiche, sono alcuni alimenti che l'industria e la civiltà hanno insegnato a procurarsi mediante la savia utilizzazione di processi fermentativi indotti oltre che da enzimi preformati, da enzimi provenienti dai veri e propri processi fermentativi di microrganismi: la vinificazione, l'industria panaria, la maltizzazione, la fiorente e ricca industria casearia, traggono tutte la loro origine dall'impiego di tali processi fermentativi. Non si potrebbe concepire un'alimentazione umana nella nostra civiltà senza l'utilizzazione di questi processi fermentativi. L'importanza pratica di tali prodotti non sta tanto nella presenza di enzimi digerenti i vari gruppi complessi delle proteine, dei grassi e dei carboidrati, quanto nella più facile assimilazione dei prodotti già in gran parte digeriti da tali microrganismi durante la preparazione e la maturazione dei diversi generi alimentari. In fondo è lo stesso meccanismo di utilizzazione dei prodotti digeriti dalla flora intestinale, secondo coloro che ammettono avere anche questa flora un significato biologico di simbiosi.

Che, d'altro canto, anche gli enzimi che si ingeriscono, siano essi provenienti dalla mucosa e dal tessuto glandolare secerente degli organi esocrini del tubo gastroenterico, siano essi pro-

venienti da organi digerenti vegetali, o persino dall'attività biologica dei fermenti organizzati, possano esplicare un'azione utile nell'organismo umano, è oggi ben dimostrato dagli effetti benefici che si osservano nelle diverse forme di enzimo e fermentoterapia, mediante la somministrazione di preparati di pepsina, tripsina, papaina e fermenti latici, che sono spesso l'unico vero rimedio utile in diverse forme di achilia o di deficiente funzionalità gastrica o pancreatica.

Tutto ciò premesso, è facile concludere che anche gli enzimi proteolitici, dimostrati ora dalle presenti ricerche nel succo d'uva, debbano avere una notevole utilità nei processi della digestione e dell'assorbimento intestinale nell'uomo, sano o malato, che ingerisce il succo d'uva, specialmente nella forma usuale di schiacciare coi denti chicco a chicco, spremendo il succo dalla buccia, dalle cui cellule deriva la maggior parte degli enzimi proteolitici del succo stesso, come dimostrano le ricerche dell'ultima nota. Con questo nuovo risultato si viene a confermare una vecchia opinione dei buongustai ampefagi, che cioè l'uva abbia oltre tutti gli altri pregi, anche quello di essere un alimento eupeptico, che faciliti cioè la digestione e l'assorbimento anche di altri alimenti, quando se ne fa uso a fin di pranzo e di cena, specialmente (aggiungeremo ora) quando siano stati ingeriti alimenti ricchi di caseina (nelle diverse forme di latticini e formaggi).

* * *

Le ricerche trattate in questa nota sono state eseguite sul succo d'uva in ambiente acido mentre altre ricerche saranno eseguite sul succo in ambiente alcalino e sui vini.

La determinazione dell'attività proteolitica del succo d'uva, come si rileva dallo stesso titolo di questa nota, è stata eseguita direttamente sul succo, senza ricorrere alla preliminare separazione dell'enzima. Ciò si è ritenuto opportuno fare poichè, da una serie di ricerche eseguite, è risultato come le diverse operazioni che si fanno subire ai succhi per separare da essi l'enzima, minorano fortemente l'attività di questo, senza per altro condurre a risultati comparabili fra un succo ed un altro, dato il diverso comportamento dei succhi stessi verso le operazioni di separazione dell'enzima.

Poichè l'attività enzimatica è stata determinata sui succhi direttamente e poichè su questa attività è probabile che influisca, oltre che la concentrazione dell'enzima, anche l'ambiente fisico-

chimico proprio del succo, si fa qui rilevare come finchè questa influenza non sarà accertata o meno nella sua esistenza ed importanza, con la dizione di attività enzimatica del succo non si voglia qui intendere concentrazione di enzima.

II.

METODO DI DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ PROTEOLITICA DEL SUCCO D'UVA

di L. CASALE

Lo studio dell'attività proeolitica dei succhi ha richiesto un lavoro preliminare relativo alla ricerca del metodo di determinazione dell'attività stessa.

Ciò è stato necessario per il fatto che i diversi metodi che si conoscono per la determinazione degli enzimi proteolitici non sono applicabili per determinazioni da eseguirsi direttamente sui mosti.

Infatti, a prescindere da altre difficoltà, sulle quali riteniamo superfluo soffermarci, non sarebbe possibile un'aggiunta nel mosto o nel vino di fibrina, come vogliono i metodi di GRÜTZNER [1] e di WILLSTÄTTER e collaboratori [2], o di caseina come vogliono i metodi di VOLLIARD e LÖHLEIN [3] e GROSS [4], o di destinaria, come vuole il metodo FULT e LEVISON [5], o di sangue, come vuole il metodo di MICHAELIS e ROTHSTEIN [6], o di albumina, come vuole il metodo SÖRENSEN [7], o di siero, come vuole il metodo RONA e KLEIMANN [8], senza veder precipitare le sostanze aggiunte per azione degli acidi e del tannino del mosto.

Nè possono servire i metodi basati sull'aumento dei gruppi carbossilici o amminici che avviene per azione proteolitica, così come è prescritto nei metodi di SÖRENSEN [9], WILLSTÄTTER e WALDSCHMIDT LEITZ [10], nè i metodi fisico-chimici, poichè, operando in un liquido complesso come il mosto, diverse sarebbero le cause di errore.

Anche il metodo di PANTANELLI [11], che segue la idrolizzazione delle sostanze proteiche naturalmente esistenti nel mosto e che a prima vista parrebbe applicabile, presenta per i nostri scopi inconvenienti vari, sui quali riteniamo superfluo intrattenerci.

Pertanto, allo scopo di eseguire le ricerche direttamente sui mosti, senza ricorrere alla preliminare separazione dell'enzima, si è studiato un nuovo metodo di determinazione che si basa sulla

proprietà che ha la caseina di entrare in sospensione colloidale incoagulabile dal tannino se è messa in presenza di una soluzione di acido fosforico, e di precipitare da questa soluzione se portata, mediante neutralizzazione, al suo posto isoelettrico, e cioè al pH di 4,7.

Il metodo, basato sull'esposto principio, consiste :

1) nel preparare una soluzione di caseina in acido fosforico, secondo le modalità che saranno descritte;

2) nel portare il mosto da studiare ad un pH di circa 1,6-1,8 e cioè al pH ottimo per l'azione dell'enzima, mediante aggiunta di acido fosforico;

3) nell'aggiungere la soluzione di caseina fosforica al mosto acidificato, al quale si aggiungono anche poche gocce di toluene, onde impedire la fermentazione;

4) nel mantenere il mosto a cui fu aggiunta la caseina in termostato a temperatura di 40° per un tempo determinato;

5) poichè la caseina aggiunta al mosto dà origine, per azione degli enzimi proteolitici, a composti i quali vengono insolubilizzati dal tannino del mosto stesso, è necessario filtrare questo appena tolto dal termostato¹;

6) dopo la filtrazione i mosti vengono portati ad un pH. di 4,7 mediante neutralizzazione con soluzione di soda normale per fare avvenire la coagulazione della caseina non attaccata dall'enzima.

Si fa qui osservare che la precipitazione della caseina ad un pH di 4,7 viene facilitata dal tannino². Per questa ragione, ed anche per il fatto che il tannino permette, come è stato avanti detto, la precipitazione dei prodotti di decomposizione della caseina per opera dei fermenti proteolitici, si consiglia, nei mosti poveri di tannino, l'ag-

¹ L'azione coagulante del tannino sui prodotti che si ottengono dalla caseina per azione degli enzimi proteolitici è stata messa in evidenza con prove di confronto eseguite sul mosto inattivato per azione del calore, sullo stesso mosto inattivato ed aggiunto di pepsina e sul mosto attivo. Tutte le suddette prove sono state eseguite con e senza tannino e da esse è risultato che l'intorbidamento si verifica solo nei campioni in cui sono contemporaneamente presenti il tannino e l'enzima, sicché deve ammettersi che l'intorbidamento sia dovuto alla presenza di sostanze che derivano dalla decomposizione della caseina per azione dell'enzima e che sono insolubilizzate dal tannino.

² L'azione coagulante del tannino sulla caseina al pH di 4,7 è stata messa in evidenza da prove eseguite su campioni di mosto decolorato con carbone ed aggiunta di pepsina prima di determinare in esso l'azione solubilizzante della caseina. Da queste prove è risultato come al pH di 4,7 si abbatta nei mosti decolorati una precipitazione incompleta della caseina, mentre la stessa precipitazione diventa completa se la neutralizzazione si fa precedere da un'aggiunta di tannino.

giunta di questa sostanza. La quantità di tannino da aggiungere deve però essere determinata con prove preliminari, poichè l'impiego di un eccesso favorirebbe la coagulazione della caseina fin dall'inizio dell'esperienza, prima cioè che si inizi l'azione proteolitica. In generale può ritenersi sufficiente l'aggiunta di cc. 10 di una soluzione all'1 % di tannino per ogni litro di mosto;

7) avvenuta la precipitazione della caseina, ciò che richiede un tempo di alcune ore a temperatura di circa 15°, si filtra, raccogliendo il precipitato su filtro senza ceneri;

8) nella caseina raccolta su filtro e ripetutamente lavata con acqua tiepida e disseccata in stufa a 80°, si determina l'azoto col microapparecchio Kjeldahl.

Per preparare la soluzione di caseina in acido fosforico si procede nel seguente modo.

Si spappa in un mortaio un grammo di caseina Hammarstein con cc. 6 di KOH 1/4 N, rimescolandolo bene fino a soluzione completa. La soluzione così ottenuta si porta in un pallone da 100, lavando bene il mortaio con acqua distillata ed aggiungendo le acque di lavaggio nello stesso pallone, fino a raggiungere il volume di cc. 80. Si aggiungono poi a poco a poco, ed agitando, cc. 10 di acido fosforico concentrato densità 1,70 e alcune gocce di toluene e quindi si porta a volume.

La quantità di mosto impiegato per ogni prova è stata di cc. 200 ai quali sono stati aggiunti prima cc. 12 di una soluzione di acido fosforico ottenuto diluendo quattro volte l'acido fosforico concentrato densità 1,70, e poi cc. 8 della soluzione fosforica di caseina.

Del mosto tenuto in termostato alla temperatura di 40° sono stati prelevati circa cc. 60 dopo un'ora di esperienza e quindi dopo un tempo di due, di quattro e di sei ore si sono eseguiti altri prelevamenti di cc. 60 ciascuno.

Il mosto di ciascun prelevamento è stato subito filtrato e su cc. 50 di filtrato sono state eseguite le operazioni descritte nei paragrafi 5°, 6° e 7° del metodo.

Di queste operazioni, la più delicata è quella della neutralizzazione per portare al pH di 4,7, poichè un eccesso o un difetto di alcali potrebbe impedire la coagulazione della caseina.

Si ottengono risultati costanti quando si abbia la cura di eseguire prove di neutralizzazione preliminari onde determinare la quantità di alcali strettamente necessaria per portare il mosto al pH di 4,7, al quale corrisponde il punto isoelettrico della caseina.

In queste prove è bene, per le ragioni che sono state avanti esposte, eseguire delle aggiunte di tannino nei mosti che ne sono poveri.

Il tannino, per la proprietà che ha di facilitare la coagulazione della caseina, funziona come indicatore nell'approssimarsi del valore di pH 4,7.

Parallelamente alle prove eseguite sui mosti attivi sono state eseguite prove sullo stesso mosto inattivato a 65° per trenta minuti ed a 95° per trenta minuti, sul mosto inattivato aggiunto di pepsina e sul mosto decolorato con carbone.

L'aggiunta di acido fosforico necessaria per portare al pH di 1,8 nel caso dei mosti inattivati va eseguita dopo l'operazione di inattivazione e successivo raffreddamento.

I risultati delle prove eseguite sono qui sotto riportati:

I) Esperienze eseguite sul mosto attivo, sullo stesso mosto inattivato alla temperature rispettivamente di 65° e di 95° per trenta minuti e su quest'ultimo aggiunto di pepsina cloridrica di Erba nella proporzione di mmgr. 20 per litro di mosto.

mmgr. d'azoto per litro corrispondenti alla cascina non decomposta:

DURATA DELL'AZIONE DELL'ENZIMA	MOSTO ATTIVO	MOSTO INATTIVATO A 65°	MOSTO INATTIVATO A 95°	MOSTO INATTIVATO A 95° ED AGGIUNTO DI PEPSSINA	
				24 ore	12 ore
	o	49	78	o	
	o	50	78	o	

Da queste prime esperienze è risultato:

1) che l'attività proteolitica del mosto è tale da decomporre completamente la caseina aggiunta nel tempo di 12 ore;

2) che la detta attività proteolitica non è distrutta completamente alla temperatura di 65° richiedendo invece una temperatura di 95°, benché da prove sulle quali non è riferito debba ammettersi un'azione enzimatica, sia pure trascurabile, anche dopo l'azione della temperatura di 95°.

II) Esperienze eseguite facendo durare l'azione dell'enzima per tempi più brevi.

MOSTO A

mmgr. di azoto per litro corrispondenti alla cascina non decomposta dall'enzima:

DURATA DELL'AZIONE DELL'ENZIMA	MOSTO ATTIVO	MOSTO INATTIVATO A 95°	MOSTO INATTIVATO A 95° ED AGGIUNTO 20 MMGR. DI PEPSSINA	
			1 ora	2 ore
		33	63	41
		27	61	32
		23	58	25
		20	58	19

MOSTO B

DURATA DELL'AZIONE ENZIMATICA	MOSTO ATTIVO	MOSTO INATTIVATO A 65°	MOSTO INATTIVATO A 65° X 95%	INATTIVATO A 59° ED AGGIUNTO DI PEPSSINA
2 ore	36	60	70	47
4 ore	16	46	68	45
6 ore	0	39	67	39

Da questa seconda serie di esperienze si rileva:

- 1) che l'attività proteolitica del mosto naturale è superiore a quella data da mmgr. 20 per litro di pepsina cloridrica Erba;
- 2) che la detta attività in alcuni mosti è tale che già dopo 6 ore tutta la caseina aggiunta è decomposta;
- 3) che in conformità di quanto era stato già rilevato nelle prime 6 ore di esperienza, l'attività proteolitica del mosto non viene distrutta completamente con un riscaldamento a 65° per 30 minuti.

Questa constatazione fa ritenere che l'attività proteolitica dei mosti sia dovuta alla presenza di enzimi diversi, dei quali alcuni, del tipo della pepsina³ vengono distrutti alla temperatura di 65° per 30 minuti, mentre altri richiedono per la loro inattivazione temperature più elevate.

III) Esperienze eseguite per determinare se il carbone esercita azione assorbente verso gli enzimi proteolitici del mosto.

Sono stati aggiunti gr. 4 di carbone decolorante ad un litro di mosto, filtrato dopo 2 ore.

Poichè in queste prove i mosti erano assolutamente privi di tannino è stata necessaria l'aggiunta di questa sostanza in proporzione di gr. 0,25 per litro di mosto fin dall'inizio dell'esperienza.

mmgr. di azoto per litri corrispondente alla caseina non decomposta dall'enzima:

DURATA DELL'ENZIMA	MOSTO DECOLORATO INATTIVATIVO		MOSTO NATURALE INATTIVATO ATTIVO	
	ATTIVO	INATTIVATO	ATTIVO	INATTIVATO
3 ore	66	61	63	22
1 ora e ½	65	63	61	19

Da queste esperienze si rileva come il carbone abbia una forte azione assorbente verso gli enzimi proteolitici del mosto.

IV) Esperienze eseguite per verificare se l'azione esercitata dal carbone è dovuta ad assorbimento dell'enzima oppure ad altre cause ignote.

³ È infatti noto, perché asserito da molti Autori, come la pepsina perda completamente la sua attività alla temperatura di 65° per 30 minuti.

Pertanto al mosto, dopo decolorazione con carbonio, è stata aggiunta la pepsina; i risultati sono stati i seguenti:

DURATA DELL'AZIONE ENZIMATICA	MOSTO DECOLORATO ED AGGIUNTO DI 25 MMGR. DI PEPSSINA PER LITRO		MOSTO DECOLORATO ED AGGIUNTO DI 50 MMGR. DI PEPSSINA PER LITRO	
	ATTIVO	INATTIVATO	ATTIVO	INATTIVATO
1 ora	37	62	31	62
2 ore	32	61	28	61
4 ore	30	62	23	62

Queste ultime esperienze mentre confermano quanto era stato ammesso circa l'azione assorbente del carbone verso gli enzimi proteolitici del mosto.

Si fanno anche osservare come, sia raddoppiando la quantità di enzima, e sia aumentando la durata di azione di questo, non si produca un proporzionale aumento dell'attività enzimatica.

Con i dati ottenuti nelle diverse esperienze si è calcolata la costante di decomposizione della caseina avvenuta per l'attività enzimatica del mosto, ammettendo che la decomposizione stessa abbia l'andamento di una reazione monomoleolare.

In tal caso, come è noto, la costante di decomposizione è data dalla formula:

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{C_0}{C_t}$$

nella quale K è il valore della costante e C₀, C_t le concentrazioni della caseina all'inizio dell'esperienza e dopo il tempo t in cui è durata l'azione dell'enzima.

I valori di queste costanti sono riportati nelle seguenti tavole, dove sono anche indicati i calcoli eseguiti per ottenerle e dove al valore della concentrazione della caseina è sostituito quello dell'azoto corrispondente espresso in mmgr.

TAVOLA I.

Relativa all'esperienza 2° (mosto A attivo).

L. IN MINUTI	Co		Ct		log Co	log Ct	log $\frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct}$	K
	Co	Ct	Co	Ct					
60	63	33	1,799	1,613	0,186	0,00301	0,00166		
120	61	27	1,785	1,431	0,344	0,00280	0,00123		
240	58	23	1,763	1,362	0,491	0,00164	0,00076		
360	58	20	1,763	1,301	0,462	0,00130	0,000450		

TAVOLA II.

Relativa all'esperienza 2° (mosto A inattivato ed aggiunto di 20 mmgr. di pepsina per litro).

L. IN MINUTI	Co		Ct		log Co	log Ct	log $\frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct}$	K
	Co	Ct	Co	Ct					
60	63	41	1,799	1,613	0,186	0,00301	0,00166		
120	61	32	1,785	1,505	0,280	0,00233	0,001152		
240	58	25	1,763	1,398	0,365	0,00152	0,00064		
360	58	19	1,763	1,279	0,484	0,00134	0,00050		

TAVOLA III.

Relativa all'esperienza 2^a (mosto B attivo).

t, IN MINUTI	Co	Ct	log Co	log Ct	$\log \frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct} = K$
120	70	36	1,845	1,556	0,289	0,00248
240	68	16	1,833	1,204	0,629	0,00262

TAVOLA IV.

Relativa all'esperienza 2^a (mosto B inattivato ed aggiunto di mmgr. 20 di pepsina per litro).

t, IN MINUTI	Co	Ct	log Co	log Ct	$\log \frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct} = K$
120	79	47	1,845	1,672	0,173	0,00144
240	68	45	1,833	1,653	0,180	0,00075

TAVOLA V.

Relativa all'esperienza 3^a (mosto naturale).

t, IN MINUTI	Co	Ct	log Co	log Ct	$\log \frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct} = K$
90	63	22	1,799	2,342	0,475	0,00508
180	61	19	1,785	1,279	0,506	0,00281

TAVOLA VI.

Relativa all'esperienza 4^a (mosto decolorato inattivato ed aggiunto di mmgr. 25 di pepsina).

t, IN MINUTI	Co	Ct	log Co	log Ct	$\log \frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct} = K$
60	62	37	1,792	1,568	0,224	0,00373
120	61	32	1,785	1,505	0,280	0,00233
240	61	31	1,785	1,491	0,293	0,00122

TAVOLA VII.

Relativa all'esperienza 4^a (mosto decolorato, inattivato ed aggiunto di mmgr. 50 di pepsina).

t, IN MINUTI	Co	Ct	log Co	log Ct	$\log \frac{Co}{Ct}$	$\frac{1}{t} \times \log \frac{Co}{Ct} = K$
60	62	31	1,792	1,491	0,301	0,00501
120	61	28	1,785	1,447	0,338	0,00281
240	61	23	1,785	1,362	0,423	0,00178

Osservando i valori delle costanti si rileva come essi vadano diminuendo col progredire del tempo di azione degli enzimi proteolici.

Conseguentemente questi diminuiscono d'attività col progredire della decomposizione della caseina.

Questo fenomeno è stato osservato anche dal PANTANELLI [12], il quale spiega il fenomeno stesso ammettendo che la reazione di decomposizione delle sostanze proteiche naturalmente esistenti nei mosti conduca ad uno stato di equilibrio.

Nel nostro caso però questa spiegazione non può ritenersi esatta ma piuttosto potrebbe pensarsi che abbiano azione ritardatrice sull'attività degli enzimi i prodotti della decomposizione della cascina.

Altre osservazioni possono farsi sui valori della costante di decomposizione della caseina. E così osservando i valori della costante dei due mosti inattivati ed aggiunti della stessa quantità di pepsina, relativi alle Tavole II e IV, si rileva come il valore della costante ai tempi rispettivi di 120 e 240 minuti subisca variazioni col variare della composizione dei mosti, fatto questo che farebbe pensare ad una certa influenza del mosto sull'attività proteolitica degli enzimi in esso contenuti.

Però, il fatto che le costanti relative alle tavole II e IV sono state determinate in tempi assai lontani dall'inizio delle esperienze, quando cioè l'enzima, per le considerazioni innanzi fatte, è stato fortemente influenzato dai prodotti della decomposizione della cascina, non fa dare troppo importanza alle precedenti considerazioni. Tanto più poi che si giunge a considerazioni opposte quando il confronto viene fatto fra le costanti relative alla tavola II e quelle relative alla tavola VI.

Quest'ultimo confronto, non soltanto ci fa escludere un'influenza della composizione del mosto sull'attività dell'enzima, ma ci porta anche ad ammettere come i valori delle costanti, se determinati prima che la decomposizione della caseina sia andata troppo oltre, siano proporzionali alla concentrazione dell'enzima.

Infatti esiste perfetta proporzionalità fra le due costanti relative alle tavole II e VI determinate dopo 60 minuti, e cioè fra le due costanti 0,00301 e 0,00373 e le rispettive concentrazioni della pepsina di 20 mgr. e 25 mgr.

Questo fatto constatato ci dice come il paragone fra l'attività enzimatica di un mosto ed una data concentrazione di pepsina deve essere fatto prima che la caseina abbia subito una decomposizione in misura superiore al 35 % circa. Ciò è conforme a quanto è stato anche constatato da von BÖMER [13] nella determinazione della eripsina col metodo WALDSCHMIDT-LEITZ.

Infine, dall'osservazione dei valori delle costanti si rileva come l'attività proteolitica di alcuni mosti da noi esaminati possa paragonarsi a quella di una concentrazione di pepsina di 50 mmgr. per litro.

III.

ATTIVITÀ PROTEOLITICA DI SUCCHI OTTENUTI

DA UVE DIVERSE

C. TARANTOLA

Nei mosti, come è noto, oltre agli enzimi proteolitici propri dell'uva, esistono anche gli enzimi appartenenti alle muffe, ai fermenti ed altri microrganismi che si trovano all'esterno dell'acino, sicché è stato necessario, allo scopo di eliminare queste azioni enzimatiche estranee, di assoggettare il grappolo ad una serie di operazioni.

Queste operazioni sono consistite nel diradare i grappoli per quindi bagnarli nell'alcool e passarli così bagnati in una fiamma, onde provocare l'accensione dell'alcool.

Dopo qualche secondo di accensione, e prima che si fosse elevata la temperatura dell'interno dell'acino, è stata spenta la fiamma mediante immersione del grappolo in acqua distillata sterile. In questa si è fatto subire al grappolo un lavaggio e quindi altro lavaggio si è fatto subire immergendolo in alcool a 95°. Tolto dall'alcool, e fatto asciugare alla temperatura di 40°, si sono distaccati dal grappolo gli acini i quali sono stati sezionati ad uno ad uno, onde separare la polpa dalle bucce e dai vinaccioli, dovendo servire per le ricerche di cui sopra solo la polpa.

Questa separazione è stata eseguita con la massima cura onde evitare inquinamento della polpa.

La polpa è stata spappolata in un mortaio e quindi versata in bevute, aggiungendo qualche goccia di toluene.

Dopo 12 ore si è filtrata e sul filtrato è stato determinato il potere proteolitico.

Per queste determinazioni sono stati impiegati cc. 400 di mosto, dei quali 200 sono stati inattivati alla temperatura di 95° per 30 minuti e 200 sono rimasti attivi.

In ciascuno dei due campioni è stato quindi aggiunto l'acido fosforico nella proporzione di cc. 12 di acido diluito 1 : 4.

Subito dopo l'aggiunta dell'acido fosforico è stata aggiunta a ciascun campione la caseina nella proporzione di cc. 8 di una soluzione al-

1% preparata con le modalità descritte nella prima parte di questa nota, e quindi, nel caso di mosti poveri di tannino è stata aggiunta questa sostanza.

L'aggiunta di tannino è assai delicata poiché un eccesso provocherebbe la precipitazione della caseina e pertanto è consigliabile fare prove preliminari su un campione dello stesso mosto che non deve servire per l'esperienza.

L'aggiunta di tannino è assai delicata poiché un eccesso provocherebbe la precipitazione della caseina e pertanto è consigliabile fare prove preliminari su un campione dello stesso mosto che non deve servire per l'esperienza.

In generale per le nostre esperienze è stata sufficiente un'aggiunta di cc. 2 di una soluzione di tannino all'1% per ogni cc. 200 di mosto.

Dopo le dette aggiunte i mosti sono stati posti in termostato a 40° e quindi si è eseguito un unico prelevamento dopo 2 ore dall'inizio dell'esperienza¹.

Il mosto appena prelevato è stato subito filtrato e cc. 50 di filtrato sono stati portati con idrato sodico normale ad un pH di 4,70.

Per determinare la quantità di acidi necessaria per portare il mosto al valore pH di 4,7 è stato eseguito all'inizio di ciascuna esperienza e su ciascun mosto da esaminare una prova preliminare determinando il pH col potenziometro.

I mosti portati al valore pH di 4,7 sono stati lasciati alla temperatura di circa 15° per qualche ora e quindi si è raccolto il precipitato su filtro senza cenere, lavando ripetutamente il bicchiere di precipitazione ed il filtro con acqua tiepida.

Il filtro col precipitato essiccato in stufa a 60° è stato introdotto nel pallone Kjeldahl e dopo distruzione della materia organica con cc. 7-8 di acido solforico concentrato, si è proceduto alla distillazione con le modalità solite, raccogliendo il distillato in cc. 40 di acido solforico 1/100 N., titolando l'acido in eccesso con soda 1/100 N. e adoperando come indicatore il rosso congo.

Operando con le modalità descritte ed impiegando il mosto e le soluzioni di acido fosforico, di caseina e di tannino nelle proporzioni indicate, si ottiene l'azoto corrispondente alla

¹ Il prelevamento è stato eseguito dopo 2 ore, poiché da prove preliminari è risultato come in detto tempo la caseina non venga decomposta in misura superiore al 40%, sicché, in conformità delle osservazioni fatte nella prima parte di questa nota, poteva esser preso il valore della costante di decomposizione della caseina come misura dell'attività enzimatica del mosto.

caseina ancora presente in un litro di mosto nel momento in cui effettua il prelevamento, moltiplicando i cc. di acido solforico 1/100 N. impiegati per il coefficiente 0,0031.

I risultati ottenuti per i diversi mosti esamini-
nati sono riportati nella tavola che segue. In
questa, oltre ai risultati ottenuti operando su
mosti preparati con le modalità sopra descritte,
sono anche riportati i risultati di ricerche eseguite
su tre mosti e precisamente quelli relativi a mosti
di due ibridi ed a un mosto di Fresia, che si sono
ottenuti per spremitura diretta degli acini, senza
preliminare separazione dalla buccia.

Nella tavola è anche riportato il dato relativo all'attività proteolitica del mosto riferito alla pepsina espressa in mgr. Tale riferimento si è
ottenuto paragonando la costante di decomposi-
zione della caseina, determinata dopo 2 ore di
azione proteolitica nei mosti, con un valore me-
dio della stessa costante ottenuta per mosti inat-
tivati ed aggiunti di mgr. 20 di pepsina per litro.
Questo valore, da prove eseguite per una du-
rata di 2 ore di azione dell'enzima, è risultato
di 0,00184.

Vitigno di provenienza del mosto	mgr. di mosto corri- spondente alla caseina presente in un litro di mosto		Costante di de- composizione teologica della caseina mosto espressa nel mosto at- tivo	Attività pro- teolitica del mosto attivo in mgr. di pep- sina per litro
	mosto inattivato	mosto attivo		
1. Ibrido . .	60	27	0,00289	31,4
2. Ibrido . .	64	24	0,00354	38,6
3. Fresia . .	70	36	0,00240	26,1
4. Alphonse Lavallée . .	70	56	0,00080	8,7
5. Italia . .	95	68	0,00121	13,2
6. Chasselas doré gross- grasus . .	89	66	0,00108	11,8
7. Mennavacea	100	72	9,00111	12,1
8. Pirovano 104	98	81	0,00076	8,3
9. Pirovano 96	101	87	0,00045	5,9
Garganega	102	90	0,00045	4,9
Chasselas d.	102	82	0,00079	8,6

I risultati delle analisi riportati nella prece-
dente tavola ci dicono:

1) che spremendo il mosto direttamente dagli acini senza previa separazione delle bucce, il valore proteolitico del mosto equivale a quello di una concentrazione di pepsina di circa mgr. 35 per litro;

2) che separando la polpa dalla buccia senza premere l'acino, il potere proteolitico del mosto è molto minore di quello ottenuto nel primo caso, e varia da valori corrispondente a mgr. 5 di pepsina a valori corrispondenti a mgr. 13 di pepsina per litro.

Riassunto. — Con un nuovo metodo di analisi chimica, si dimostra che nel succo d'uva, immediatamente spremuto dai chicchi freschi e indipendentemente dai vinaccioli, esistono enzimi proteolitici capaci di sciogliere la caseina, in determinate condizioni di pH. Essi provengono in gran parte dagli elementi cellulari della buccia, in parte si trovano però anche nel succo della polpa. Poiché l'attività proteolitica si svolge a un pH uguale a quello del succo gastrico umano, si deve ammettere che colla ingestione del succo d'uva fresco, mediante il comune uso di stritolare con denti succhiare accuratamente i chicchi del grappolo, l'attività proteolitica si conserva ed estende nell'interno dello stomaco, coadiuvando l'azione enzimatica del succo gastrico. In tal modo si viene a dimostrare che il succo d'uva possiede, oltre le note proprietà alimentari, dovute ai suoi componenti chimici, un'importante proprietà biochimica, che giustifica una vecchia opinione, quella che il succo abbia anche un potere euteptico, facilitante cioè la digestione delle proteine.

(Lavoro eseguito nella R. Stazione
enologica di Asti, Direttore: L. CASALE)

LETTERATURA

- [1] GRÜTZNER, « Pflügers. Arch. f. d. ges. Physiol. », Bd. 144, S. 545, 1912.
- [2] WILLSTÄTTER, « Zeitschr. physiol. Chem. », 152, 164, 1926.
- [3] VOLHARD e LÖHLEIN, « Münch. med. Wochenschr. », n. 49, 1903.
- [4] GROSS, « Berlin Klin. Wochenschr. », n. 13, S. 643, 1908.
- [5] FULD e LEVISON, « Bioch. Zeitschr. », Bd. 6, S. 473, 1907.
- [6] MICHAELIS e ROTSTEIN, « Bioch. Zeitschr. », Bd. 105, S. 60, 1920.
- [7] SØRENSEN, « Bioch. Zeitschr. », Bd. 21, S. 288, 1909.
- [8] RONA e KLEIMANN, « Bioch. Zeitschr. », Bd. 140, S. 478, 1923.
- [9] SØRENSEN, « Bioch. Zeitschr. », 7, 54, 1908.
- [10] WILLSTÄTTER e WALDSCHMIDT-LEITZ, « Ber. Deutsch. Chem. Ges. », 54, 2088, 1921.
- [11] PANTANELLI, « Zentralblatt f. Baktr. », II Abt. Bd. 31, pag. 544-559; Bd. 42, pag. 480-502.
- [12] — opera citata.
- [13] BÖMER, JUCKENACK-TILLMANS, « Handbuch der Lebensmittelchemie », Bd. II, 2, Tl. pag. 749.



321079

55240

