

# Contributi alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati

C. Antoniani - A. Candia - T. Castelli

(Ricevuto il 15 novembre 1940-XIX)

## NOTA I

Conosciamo assai poco sul chimismo fermentativo dei lieviti apiculati. Il loro potere di fermentazione è in genere poco elevato e per lo più si arresta quando il substrato raggiunge un tenore in alcol del 4-5 per cento in volume. Se la frazione di zucchero che viene fermentata lo sia conformemente agli schemi oggi ammessi per il decorso fermentativo normale non è per altro ancora stabilito. Ignoriamo se la cellula degli apiculati contenga per intero o solo in parte il sistema enzimatico della zimasi, o se a fianco degli enzimi di questo sistema, altri ne siano presenti, capaci di influenzare il decorso normale della fermentazione attraverso una inserzione di processi paralleli o derivati. È noto che i lieviti apiculati sono forti produttori di acidi volatili, e in particolar modo di acido acetico e di acido formico. Ma non è chiarito se questa acidità volatile sia unicamente in relazione al potere di attacco di questi lieviti per gli acidi fissi normalmente contenuti nei mosti, oppure se essa dipenda da una deviazione del processo di demolizione glucidica dopo la fase di formazione dell'aldeide acetica. Se sia cioè imputabile a questi lieviti una particolare tendenza verso quel tipo di fermentazione, che potremmo dire semi-ossidativa, e che il Neuberg ha designato come terza forma di fermentazione.

L'importanza dello studio del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati non è tale soltanto dal punto di vista dottrinario. E' noto in quale misura questi lieviti concorrano a determinare i normali processi di fermentazione del mosto d'uva (1). Si è discusso molto, e si discute tuttora, sulla entità e sui limiti dell'influenza che gli apiculati esercitano sulla vinificazione. Per quanto la questione sia complessa e tale da non potersi inquadrare in rigide norme di valore generale, è noto a questo riguardo come le vecchie opinioni sostenute dal Müller-Thurgau e da altri, e secondo cui i lieviti apiculati agendo in concorrenza col lievito ellittico avrebbero manifestato azione sfavorevole sulla vinificazione, non può più oggi essere condivisa, soprattutto dopo le sistematiche e probatorie esperienze del De Rossi (2). Esclusa una influenza nociva, e poichè è di per sè evidente che un lievito il quale pressochè da solo presiede ai primi stadi, almeno, della fermentazione del mosto d'uva, una influenza comunque sia la deve esercitare, bisogna a *fortiori* ammettere che anche gli apiculati contribuiscano a determinare ciò che siamo soliti indicare come buon andamento della vinificazione

In quale modo? E attraverso la formazione di quali sostanze? E come e in qual misura interferendo e modificando il chimismo che è proprio dei

lieviti ellittici? Questi ed altri ancora, facili ad intuirsi, sono i problemi che si pongono dal punto di vista pratico, ed alla cui soluzione non si potrà soddisfacentemente giungere se non studiando, sia in vivo che in vitro, il comportamento generale sia dei lieviti apiculati che degli ellittici, e, in particolare modo, il comportamento che deriva dalla loro associazione. Ci inse-riamo qui in un argomento di vasta portata generale, quello dello studio delle fermentazioni associate. Argomento ancor troppo scarsamente indagato, se pure per esso si prospettino assai fruttuosi sviluppi nel campo della zimo-chimica.

Le esperienze di cui riferiamo in questa nota, riguardano alcune prove di fermentazione con *Pseudosaccharomyces apiculatus*, un lievito apiculato descritto dal De Rossi (3) e da questi indicato come produttore di quantità considerevoli di acidi volatili. Le prove vennero eseguite allo scopo di inda-gare la natura del processo di genesi di questi acidi, in relazione alle due distinte possibilità, già accennate in precedenza, che per essa si prospettano.

Una parziale deviazione della prima forma di fermentazione di Neu-berg verso la terza, non può logicamente essere esclusa. Le condizioni che si richiedono per il suo manifestarsi, se pure in ridotta misura, si verificano sempre *ad latere* del processo fermentativo normale. E in considerazione di questo fatto si ammette da molti che la piccola frazione di acidi volatili (essenzialmente acido acetico) che si forma nella fermentazione alcolica nor- male, derivi direttamente dallo zucchero per questa via. Conformemente allo schema formulato dal Neuberg per la terza forma di fermentazione, l'acido volatile che così si origina dovrebbe essere accompagnato dalla for- mazione di glicerina. La misura dell'accumulo di questa, e, più ancora, la misura del suo parallelismo con l'accumulo dell'acido, dovrebbero per tanto costituire, in via teorica, un indice diretto dello svolgersi di questo processo. Sta però di fatto che la misura dell'entità con cui la terza forma di fermen- tazione può partecipare alla fermentazione alcolica normale, urta in diffi- coltà notevoli, insite in buona parte nelle stesse disformità di comportamento dei lieviti, e costituisce, a tutt'oggi, un problema ancora aperto all'indagine.

D'altra parte, il fatto che i lieviti apiculati siano segnalati tra gli attivi demolitori della molecola degli acidi organici del mosto d'uva (4), legittima la supposizione che gli acidi volatili possano formarsi anche come prodotti di questa demolizione. Il Meissner (5) ha constatato che il *Sacch. apiculatus* può trasformare l'acido malico e l'acido tartarico in acido lattico. La succes- siva trasformazione biochimica di quest'ultimo in acido acetico, è nota da tempo per azione batterica (6), e Neuberg e Tier (7) l'hanno dimostrata an- che per lo stesso lievito in vivo. Alcune razze degli stessi lieviti apiculati (8) sono inoltre capaci di demolire ulteriormente l'acido lattico, ed è sen'altro ammissibile che l'acido acetico e l'acido formico compaiano tra i prodotti di questa demolizione. Che questo particolare processo di *fermentazione de- gli acidi organici fissi* del mosto d'uva, costituisca se non l'unica, almeno la principale fonte degli acidi volatili del vino, è assai probabile. Sorge anche qui il problema della sua dimostrazione, ma a questo riguardo ci sembra che alcune considerazioni, che ora esporremo, possano fornire un utile indi- rizzo di indagine.

E' dimostrato che la formazione degli acidi volatili ha luogo principalmente durante la fase della fermentazione principale. Successivamente, secondo i risultati ottenuti dal Lucchetti (9), si avrebbe una graduale diminuzione di questa acidità, per esterificazione o demolizione ulteriore della molecola dell'acido. Fermentazione alcoolica dello zucchero e fermentazione degli acidi organici fissi decorrono cioè parallelamente. Ciò ammesso, è prevedibile tra i due processi una forzata interferenza, *manifestantesi attraverso l'intervento dell'attività carboligasica*.

Chiariamo il concetto. Secondo quanto sappiamo sul chimismo generale delle azioni fermentative, la formazione di acido acetico (o formico) a partire dall'acido tartarico o malico, deve, in modo analogo a quanto avviene per la fermentazione alcolica, passare obbligatoriamente per lo stadio intermedio di formazione dell'aldeide acetica. Nel mosto si vengono quindi a svolgere contemporaneamente due distinti processi fermentativi entrambi passanti per lo stadio obbligato di quest'aldeide. Ma per effetto della diversità di concentrazione e della diversa natura del relativo substrato, oltre che delle diverse specie di attività enzimatiche che essi chiamano in giuoco, questi due processi non possono decorrere cineticamente simultanei. Essi si svolgeranno sfasati l'uno rispetto all'altro, e le due molecole di aldeide acetica, a cui entrambi danno luogo nel corso del loro svolgimento, si formeranno con larga probabilità statistica in momenti distinti. Quando la seconda molecola di aldeide si forma, essa, *in statu nascendi*, si trova di fronte ad un'altra molecola di aldeide preformata e proveniente da altro processo fermentativo, quindi extrafermentativa rispetto alla prima. Si vengono con ciò a determinare, conformemente a quanto è stato dimostrato dal Neuberg, condizioni favorevoli all'intervento dell'attività carboligasica, cioè alla condensazione aciloinica dell'aldeide acetica.

\*\*\*

Partendo da queste considerazioni, ci siamo proposti di indagare se l'eccedenza di acidità volatile che i lieviti apiculati producono in confronto dei lieviti ellittici trovasse riscontro in variazioni qualitative o quantitative tra i prodotti dell'attività carboligasica.

Un primo gruppo di esperienze di fermentazione su mosti d'uva di varia composizione, rispettivamente con *Pseudosacch. apiculatus* e *Sacch. ellipsoideus*, ci hanno condotto a risultati in soddisfacente accordo con la nostra ipotesi. Le fermentazioni in presenza di *Pseudosacch. apiculatus* sono apparse caratterizzate dalla costante presenza di quantità notevoli di acetoina, fatto che viceversa non si nota per le fermentazioni in presenza di *Sacch. ellipsoideus*, nelle quali l'acetoina o manca, o è presente in tracce o comunque in quantità sempre assai inferiori.

La quantità di acetoina riscontrata nelle fermentazioni in presenza di lievito apiculato non è in diretta correlazione col tenore in acidi volatili. Né ciò, del resto, era da attendersi, date le ulteriori possibilità di trasformazione del chetoalcol. Un quadro completo delle correlazioni in tal senso esistenti si potrà avere solo quando l'indagine sarà estesa anche alla determinazione del 2-3 butilenglicol, il che stiamo facendo. Ma già sin d'ora il fatto che le fermentazioni con lieviti apiculati appaiano caratterizzate da un relativo

maggior accumulo di acetoina, sta a dimostrare per questi lieviti un caratteristico comportamento differenziale, di indubbio interesse.

Che il processo di sintesi acetoinica sia in qualche modo collegato alla genesi degli acidi volatili, risulta anche da alcune nostre esperienze di fermentazione in presenza di *Torulopsis pulcherrima*, sulle quali riferiremo prossimamente. Anche qui la formazione di notevoli quantità di acidità volatile è accompagnata da un più sensibile accumulo di acetoina.

#### ESPERIENZE

Vennero utilizzati per le prove di fermentazione tre mosti di uva bianca, contenenti rispettivamente:

mosto N. 1:	zucchero	16,45%
	acidità	0,90%
mosto N. 2:	zucchero	9,90%
	acidità	1,30%
mosto N. 3:	zucchero	14,70%
	acidità	1,35%

Le fermentazioni vennero compiute su mosto previamente sterilizzato per un'ora a 100° in vapore fluente, innestando con uguali quantità di lievito di coltura pura. Dopo avviamento in termostato a 30° C. le fermentazioni si svolsero a temperatura ambiente.

Le analisi vennero eseguite secondo i metodi ufficiali per quanto concerne l'alcool, lo zucchero e l'acidità. L'acetoina venne determinata secondo L. C. E. Kniphorst e C. J. Kruisher (10).

#### RISULTATI ANALITICI

Prova A Mosto N. 1 Durata della fermentazione: 52 giorni	Composizione del liquido fermentato (in grammi per 100 cc.)	
	Apiculatus	Ellipseidous
Zucchero . . . . .	7,00	0,15
Alcool . . . . .	4,30	7,50
Acidità totale . . . . .	1,20	1,10
Acidità volatile . . . . .	0,11	0,07
Acetoina . . . . .	0,030	tracce
Prova B Mosto N. 1 Durata della fermentazione: 24 giorni	Composizione del liquido fermentato (in grammi per 100 cc.)	
	Apiculatus	Ellipseidous
Zucchero . . . . .	7,90	0,25
Alcool . . . . .	4,00	6,90
Acidità totale . . . . .	1,25	1,30
Acidità volatile . . . . .	0,14	0,03
Acetoina . . . . .	0,018	0,002
Prova C Mosto N. 2 Durata della fermentazione: giorni 22	Composizione del liquido fermentato (in grammi per 100 cc.)	
	Apiculatus	Ellipseidous
Zucchero . . . . .	1,40	tracce
Alcool . . . . .	4,10	4,60
Acidità totale . . . . .	1,35	1,45
Acidità volatile . . . . .	0,12	0,03
Acetoina . . . . .	0,009	assenza

Prova C Mosto N. 3 Durata della fermentazione: giorni 14	Composizione del liquido fermentato (in grammi per 100 cc.)	
	Apiculatus	Ellipseidous
Zucchero . . . . .	7,90	0,90
Alcool . . . . .	4,00	6,50
Acidità totale . . . . .	1,25	n. d.
Acidità volatile . . . . .	0,14	0,04
Acetoina . . . . .	0,018	assenza

Istituto di Industrie Agrarie della R. università di Perugia.  
Perugia, 5 novembre 1940-XIX.

#### RIASSUNTO

Gli AA. Comunicano i primi risultati di una serie di indagini sulle correlazioni tra formazione degli acidi volatili e processo di condensazione aciloinica nei lieviti alcolici.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mitteilung der Resultate einer ersten Versuchsreihe der Verff. Über die Wechselbeziehungen zwischen der Bildung flüchtiger Säuren und dem Acyloin-Kondensationsprozess in alkoholischen Hefen.

#### BIBLIOGRAFIA

(1) *G. De' Rossi* - I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra (Relazione al IV Congresso Internazionale della vigna e del vino – Losanna, 1935).

*T. Castelli* - I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e nelle zone limitrofe (Nuovi Annali dell'Agricolt. – A. XIX, 1939).

*T. Castelli* - Ancora sui lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti Classico (idem).

- (2) *G. De' Rossi* - I lieviti apiculati nella fermentazione vinaria (Le Staz. Sperim. Agricole Italiane - vol. 53, pag. 233, 1920).
- (3) *Idem* (L. c.).
- (4) *I. Schukow* - Citato da De' Rossi (L. c.).
- (6) *C. Mazé* - Comptes rendus, 156, 1101; 1913.
- (7) *Bio Z.* 32, 325; 1911.
- (8) *G. De' Rossi* - (L. c.).
- (9) *G. Lucchetti* - Sul rapporto tra sviluppi di apiculati e formazione di acidità volatile nella fermentazione vinaria. (Bollettino della Facoltà Agraria di Pisa - Vol. XVII - Anno 1936 - XV).
- (10) *Handbuch der Lebensmittel* - Chemie - Vol. VII<sup>o</sup> pag. 376
-

