

## **Il rapporto acetoina-glicol nelle fermentazioni associate di *Sacch. ellipsoideus* + *Pseudosacch. apiculatus* e di *Sacch. ellipsoideus* + *Pseudosacch. magnus*.**

**Claudio Antoniani e Tommaso Castelli**

(Ricevuto il 10 febbraio 1942-XX)

Ricerche precedenti (1) hanno dimostrato una netta diversità di comportamento tra *Sacch. ellipsoideus* da un lato e *Pseudosacch. apiculatus* e *Pseudosacch. magnus* dall'altro, nei riguardi della fisionomia del processo di condensazione acetoinica che si svolge, a quanto sembra, quale processo accessorio obbligato, a fianco della fermentazione alcolica normale. Mentre il lievito ellittico è caratterizzato da un esclusivo accumulo di 2-3 butilenglicole in assenza di acetoina, tanto *Ps. apiculatus* quanto *Ps. magnus* sono caratterizzati da accumulo di acetoina in assenza di glicol. Questa differenza di comportamento rispecchia probabilmente una profonda diversità di valore nel potenziale di ossidazione dei due tipi di lievito il che vale a conferirle un notevole significato anche dal punto di vista della diversità di indirizzo fermentativo globale che i detti lieviti acquistano, o possono acquistare, in presenza di un substrato di fermentazione estremamente complesso come è quello del mosto d'uva. Tra l'altro in relazione al processo di genesi dell'acidità volatile, al quale riguardo alcune correlazioni già sono state poste in evidenza, se pure per ora in modo non assoluto, in ricerche precedenti (2).

Dato questo comportamento dei tre lieviti singoli, era interessante indagare quale fosse il comportamento dei lieviti stessi in associazione fermentativa. Il chimismo delle fermentazioni associate è invero ancora tutto da fare. E però è ancor tutto da fare ciò che concerne il chimismo sostanziale ed accessorio della fermentazione abituale del mosto d'uva, determinata sempre, come è risaputo, non da un solo lievito ma da una notevolissima varietà di forme (3) spesso assai diverse come abito fermentativo e come indirizzo di metabolismo e perciò verosimilmente portatrici di complessi diversi di attività zimasiche. Che il chimismo fermentativo delle fermentazioni associate non sia la semplice somma dei vari chimismi fermentativi dei singoli lieviti componenti l'associazione è un fatto logicamente prevedibile se si pensa alla complessità e alla molteplicità dei prodotti che, come intermedi obbligati, fondamentali ed accessori, compaiono nel processo di fermentazione alcolica. Un dato lievito, attraverso i suoi sistemi enzimatici specifici, è in grado di stabilizzare in equilibri particolari sostanze intermedie che un altro lievito viceversa indirizza verso trasformazioni ulteriori. E allo stesso modo il pro-

dotto accessorio costante di una fermentazione singola può mancare nella fermentazione associata di questo lievito con un altro. Non solo, ma il fatto stesso, abbastanza diffuso, della fermentazione parziale di uno zucchero, può essere annullato attraverso una complementarità di azione di due forme di lievito associate, di cui l'una capace di realizzare il primo stadio della trasformazione e l'altra di realizzarne i successivi, attraverso una ripresa dei prodotti dell'attività fermentativa del primo.

Nel caso specifico che qui ci interessa, si trattava di vedere se e sino a qual punto l'abbinamento di due lieviti *caratterizzati da una opposta fisionomia di condensazione acetoinica*, desse luogo al manifestarsi di una supremazia dell'un chimismo rispetto all'altro.

Il comportamento delle fermentazioni associate dei tre lieviti in esame venne studiato su tre distinti rapporti numerici di associazione. Poichè è noto che il lievito ellittico sopravanza in genere assai rapidamente gli apiculati, oltre al gruppo di prove di fermentazione insemenzate con quantità praticamente uguali dei due lieviti ne abbiamo posto in esperienza altri due gruppi insemenzati con una eccedenza dell'apiculato sull'ellittico rispettivamente da 1 a 10 e da 1 a 50.

I risultati da noi conseguiti possono essere in breve riassunti come segue.

Nei riguardi della fisionomia del processo di condensazione acetoinica è stata osservata in generale una netta e assoluta predominanza del comportamento proprio del lievito ellittico. Ciò non soltanto nelle fermentazioni in cui lievito ellittico e lievito apiculato vennero seminati in parti praticamente uguali, il che già era emerso da osservazioni precedenti (4), ma nelle stesse fermentazioni in cui, con la semina, era stata inizialmente conferita ai lieviti apiculati una larga supremazia numerica sugli ellittici. Le fermentazioni svoltesi in presenza di quantità di lievito apiculato cinquanta volte superiori alla quantità di lievito ellittico non mostrano infatti formazione alcuna di acetoina, mentre divenne ad un certo punto palese, in tutte le esperienze, la presenza del 2-3 butilenglicole. Piccole quantità di acetoina sono state riscontrate, dopo 25 giorni dalla semina, in una delle prove dell'associazione *Sacch. ell. + Pseudosacch. apiculatus*, ma si tratta qui evidentemente di acetoina di origine secondaria, derivante cioè dalla riossidazione del glicol, come già altra volta venne messo in evidenza (5).

Merita però di essere rilevato il fatto che in entrambi i gruppi di fermentazioni associate con rapporto da 1 a 10 tra lievito ellittico e lievito apiculato, l'acetoina sia pure in piccola quantità, è stata riscontrata. Essa è apparsa presente solo nei primi stadi della fermentazione cioè quando il tenore in alcol del mosto in fermentazione era ancora relativamente basso, ma è ad ogni modo significativo il fatto che essa si sia formata malgrado la già detta predominanza numerica del lievito ellittico. Così, ad esempio, (si veda la relativa tabella) sono stati riscontrati mg. 2,5 di acetoina per 100 cc. di mosto, in corrispondenza di un rapporto di 80 cellule di *Sacch. ell.* per 20 di *Pseudosacch. apiculatus*. E quantità di acetoina non dosabili per via chimica ordinaria, ma ben identificabili nella forma del derivato nichel-gliossimico, sono state riscontrate per l'associazione *ellittico-magnus*; anche in corrispondenza di un rapporto di 98 cellule di ellittico per 2 di *Ps. magnus*.

Quale sia la ragione per cui la presenza di acetoina non si è mai notata nelle associazioni col rapporto iniziale di 1 a 50 tra lievito ellittico ed apiculato non sapremmo dire. Questo comportamento può sembrare in contraddizione col precedente, ma è certo che sull'attendibilità del reperto non può sorgere alcun dubbio trattandosi di un risultato costante, fornito da ciascuna delle singole prove costituenti i due gruppi di associazioni di lievito in esperienza. L'acetoina è risultata sempre assente (si vedano le tabelle relative) anche in corrispondenza dei primi stadi di fermentazione, quando ciascuno dei due lieviti apiculati era in netta e larga eccedenza sull'ellittico. Dal che si deve a *fortiori* concludere, e già lo abbiamo detto, che gli effetti della fisiologia della condensazione acetoinica, cioè nei riguardi dell'equilibrio acetona 2-3 butilenglicole, ciò che prevale è la spiccata attività riducente del lievito ellittico, atta a spostare praticamente per intero questo equilibrio verso destra. Il quale fatto, se pure in altre condizioni di attività del lievito ellittico, era stato messo in evidenza anche in precedenti ricerche. (6)

Non possiamo però per questo affermare che nelle associazioni di lievito ellittico e lievito apiculato l'influenza del lievito apiculato sia stata senz'altro nulla. È infatti da rilevarsi a questo riguardo come nelle associazioni con rapporto di 1 a 50 non soltanto sia apparsa costantemente assente l'acetoina, ma sia apparsa altresì fortemente ritardata la formazione del 2-3 butilenglicole, il che non può attestare altro che un ritardo nello stesso processo sostanziale di condensazione aciloinica dell'aldeide acetica.

Nelle ormai numerosissime esperienze eseguite al riguardo, abbiamo sempre osservato che nelle fermentazioni singole di *Pseudosacch. apiculatus*, *Pseudosacch. magnus* e *Saccharomyces ellipsoideus*, il 2-3 butilenglicole o, rispettivamente, l'acetoina, compaiono in quantità notevole già negli stadi iniziali del processo fermentativo; nel caso dell'attuale associazione, invece, la formazione del glicole ancora non è palese quando la fermentazione è già per metà compiuta, e si mantiene relativamente bassa anche alla fine della fermentazione stessa. Sembrerebbe quindi che ai due lieviti apiculati da noi presi in esame spetti *un non trascurabile potere ossidante in apposizione al netto potere riducente già dimostrato (6) per il lievito ellittico* e che dalla opposizione di queste due antitetiche proprietà risulti influenzabile non la sola *fisionomia* della condensazione acetoinica cioè l'equilibrio di ossiriduzione acetoina glicole ma la stessa possibilità di svolgimento del processo di condensazione acetoinica, il cui meccanismo verrebbe pertanto ad essere condotto nel novero dei processi di ossiriduzione. Vogliamo a questo proposito ricordare le interessanti vedute recentemente esposte dal Semerano (7) nei riguardi della condensazione benzoica, che viene per l'appunto considerata come una reazione di ossidoriduzione.

Sotto altro aspetto, un ultimo rilievo è possibile dai nostri risultati, ed esso riguarda l'influenza del tenore alcolico sullo sviluppo dei lieviti apiculati. È opinione diffusa che al disopra di un certo contenuto in alcol (5-6%) lo sviluppo dei lieviti apiculati sia impedito. Al riguardo si è lungamente discusso anche recentemente (8).

Senza rientrare qui in argomento, ci limitiamo a segnalare come anche in presenza di notevoli quantità di alcol le cellule apiculate siano state ri-

Fermentazioni associate di *Sacch. ellipsoideus* e *Pseudosacch. magnus*.

Rapporto alla semina: 1 a 1.

	numero % cellule		% alcol in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. magn.			
dopo 2 giorni di ferm.	94	6	1,80	ass.	ass.
» 4 » » »	95	5	5,00	ass.	p. q.
» 7 » » »	99,9	0,1	7,50	ass.	mg. 3,6

Rapporto alla semina: 1 a 10.

	numero % cellule		alcol % in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. magn.			
dopo 2 giorni di ferm.	95	5	2,00	p. q.	ass.
» 3 » » »	98	2	2,80	p. q.	ass.
» 4 » » »	99,5	0,5	6,40	ass.	mg. 3,0

Rapporto alla semina: 1 a 50.

	numero % cellule		alcol % in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. magn.			
dopo 1 giorno di ferm.	25	75	p. q.	ass.	ass.
» 2 giorni » »	50	50	2,80	ass.	ass.
» 3 » » »	70	30	4,30	ass.	ass.
» 9 » » »	80	20	10,40	ass.	mg. 4,8
» 25 » » »	90	10	9,80	ass.	mg. 16,0

Fermentazioni associate di *Sacch. ellipsoideus* e *Pseudosacch. apiculatus*.

Rapporto alla semina: 1 a 1.

	numero % cellule		alcol % in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. apic.			
dopo 2 giorni di ferm.	90	10	2,40	ass.	ass.
» 4 » » »	95	5	3,90	ass.	ass.
» 7 » » »	98	2	8,00	ass.	mg. 2,5

Rapporto alla semina: 1 a 10.

	numero % cellule		alcol % in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. apic.			
dopo 2 giorni di ferm.	66	34	1,80	p. q.	ass.
» 3 » » »	80	20	2,60	mg. 2,5	ass.
» 4 » » »	90	10	4,70	tr.	ass.
» 6 » » »	97	3	7,20	ass.	mg. 12,0

Rapporto alla semina: 1 a 50.

	numero % cellule		alcol % in vol.	acetoina in 100 cc.	glicol in 100 cc.
	di Sacch. ell.	di Ps. apic.			
dopo 1 giorno di ferm.	10	90	p. q.	ass.	ass.
» 2 giorni » »	40	60	2,00	ass.	ass.
» 3 » » »	40	60	4,30	ass.	ass.
» 9 » » »	50	50	9,30	ass.	mg. 4,5
» 25 » » »	85	15	8,50	mg. 2,00	mg. 12,0

scontrate presenti in numero rilevante. Significativa, ad esempio, la presenza di 50 cellule di apiculato per 50 di ellittico di fronte a un tenore in alcol di 9,3 %.

## PARTE SPERIMENTALE

Tutte le fermentazioni si sono svolte su mosto d'uva bianca (contenente il 20,5 % di zucchero e con un'acidità complessiva pari al 0,90% di acido tartarico) preventivamente sterilizzato *in toto*, poscia separato dal coagulo per filtrazione e nuovamente sterilizzato dopo distribuzione nelle singole beute. Ciascun gruppo di esperienze risultava da un certo numero di fermentazioni distinte, svolgentesi ciascuna a sè. A opportuni intervalli di tempo una o più prove venivano interrotte per le determinazioni analitiche, eseguite secondo i metodi soliti, già da noi più volte riferiti in precedenza. Per le prime 24 ore le fermentazioni si svolsero in termostato a 30°, successivamente alla temperatura ambiente di 15-17°. I blastomiceti usati nelle presenti ricerche sono stati isolati dai mosti umbri durante la vendemmia del 1933 (10) essi sono: *Sacch. ellipsoideus Hansen* (stipite 20), *Pseudosacch. apiculatus (Rees) Klöcker* (stipite 70), *Pseudosacch. Magnus De Rossi* (stipite 103). Nella prima serie di esperienze sono state seminate le mescolanze (20 + 70) e 20 + 103) in quantità per quanto possibili uguali. Nella seconda serie i lieviti apiculati sono stati mescolati allo stipite 20 in rapporto di 1 per lo stipite 20 e di 10 per i singoli lieviti apiculati. Nella terza il rapporto venne elevato a 50 cellule di apiculato per una di ellittico. L'inseminamento si faceva da patine di agar culture di 3 giorni a 30°, sviluppate su agar di malto, utilizzando sempre la medesima ansa di platino.

Per la valutazione del rapporto in cui si mantenevano le due specie di blastomiceti nel corso della fermentazione, l'indagine è stata eseguita sia a mezzo di osservazioni microscopiche (preparato fresco e preparato con liquido di Ziehl) sia a mezzo di analisi culturali, su substrato di gelatina di mosto che, come è noto, è un terreno di cultura molto rispondente per i blastomiceti. Per ogni analisi venivano allestite le consuete tre piastre.

Sembrerà forse superfluo l'aver eseguita anche l'indagine culturale, poichè con l'osservazione microscopica molto accurata si riesce benissimo a distinguere le cellule ellittiche dalle apiculate, ma così non è quando si pensi che nel corso della fermentazione molte cellule possono morire e pertanto soltanto il metodo culturale poteva dare un'espressione reale del numero e del rapporto dei blastomiceti seminati. Nelle piastre seminate con la mescolanza ellittico-apiculato la differenza evidentissima delle colonie permetteva subito di stabilire il rapporto dei due blastomiceti. Nel caso della mescolanza ellittico-magnus, stante la forte somiglianza delle colonie, ci si è valse utilmente di preparati per impressione allestiti sulla prima piastra che risulta sempre molto ricca di colonie. I preparati così ottenuti venivano colorati e sottoposti all'esame microscopico. Generalmente il risultato dell'osservazione microscopica corrispondeva abbastanza esattamente a ciò che si stabiliva coll'indagine culturale.

## RIASSUNTO

Ricerche precedenti hanno dimostrato che l'equilibrio Acetoina (A)-Glicol butilenico (GB) nelle fermentazioni singole di *Pseudosacch. apiculatus* e di *Pseudosacch. magnus* è spostato per intero a favore di (A). Esso è spostato invece a favore di (GB) nelle fermentazioni singole di *Saccharomyces ellipsoideus*.

Gli Autori hanno ora indagato sotto questo stesso aspetto il comportamento delle fermentazioni associate dei detti lieviti, riscontrando una netta e costante predominanza della fisionomia fermentativa del lievito ellittico: presenza cioè di (GB) ed assenza di (A).

## ZUSAMMENFASSUNG

Frühere Untersuchungen haben bewiesen dass im Laufe der einzelnen durch *Pseudosacch. apiculatus* und *Pseudosacch. magnus* bewirkten Gärungen, das Verhältnis Acyloin (A)-Butylenglycol (GB) ganz zu Gunsten des Acyloins verschoben wird. Im Laufe der einzelnen Gärungen des *Saccharomyces ellipsoideus*, fällt statt dessen das Verhältnis zu Gunsten des Butylenglycols aus.

Verff. haben jetzt das Verhalten der assoziierten Gärungen der genannten Hefen vom gleichen Gesichtspunkte aus studiert und haben ein deutliches und beständiges Vorherrschen der Gärungsphysiognomie der elliptischen Hefe beobachtet, das heisst: Anwesenheit des Butylenglycols und Abwesenheit des Acyloins.

## BIBLIOGRAFIA

(1) C. Antoniani e G. Gugnoni. - «La condensazione aciloinica nei lieviti apiculati e nei lieviti ellittici», Biochim. e Ter. Sperim. 27, 143 (1940).

C. Antoniani, G. Gugnoni e P. Scrivani - «La condensazione aciloinica nei lieviti apiculati e nei lieviti ellittici». Nota 2. Biochim. e Ter. Sperim. 28, 7 (1941).

(2) C. Antoniani, A. Candia e T. Castelli - « Contributo alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati ». Ann. Micr. Vol. I, fasc. 3; 1941.

T. Castelli - « Indagini chimiche sui blastomiceti ». Ann. Micr. Vol. I, fasc. 6, 1941.

T. Castelli - « Temperatura e chimismo dei blastomiceti ». Vol. II, fasc. 1°, 1941.

(3) G. De Rossi - « I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra ». Rel. IV Congr. Int. della vigna e del vino. Lausanne, 1935.

*T. Castelli* - « I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico ». Nuovi annali dell'agricoltura. Anno XIX, 1939.

*T. Castelli* - « Ancora sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti classico ». Nuovi annali dell'agricoltura. Anno XIX, 1939.

(4) *C. Antoniani* - « L'acetilmetilcarbinolo nei vini ». Ann. Chim. Appl. Vol. 31, fasc. 10; 1941.

(5) *C. Antoniani*, idem, idem.

(6) *C. Antoniani, G. Gugnoli e P. Scrivani* L. c.

(7) *G. Semerano* - « Proprietà ossido-riduttive delle aldeidi e condensazione benzoica ». Gazz. Chim. It. Vol. 71; fasci. 7; 1941.

(8) *T. Castelli* - « In tema di fermenti alcolici ». Il Coltivatore e Giornale Vinicolo Italiano N. 6 e N. 13; 1940.