

Sul fenomeno di autoimpedimento fermentativo e sulle cause atte a rimuoverlo. Osservazioni su *Pseudosaccharomyces apiculatus*

Claudio Antoniani

(Ricevuto il 3 Aprile 1943 - XXI)

Ho indicato col nome di *autoimpedimento fermentativo* (1) l'interessante e tutt'ora inspiegato fenomeno per effetto del quale l'attività fermentativa di alcuni lieviti alcoolici, dopo essersi iniziata con tutti i caratteri di una fermentazione normale, si arresta precocemente, malgrado cioè la persistente presenza di zucchero fermentescibile. Il fatto del pronto e normale inizio della fermentazione dimostra che il fattore ostacolante non preesiste nel mosto, ma che è nel corso e per effetto della fermentazione stessa che questo fattore si genera: la designazione di *autoimpedimento* è quindi pienamente giustificata. Quali le cause del fenomeno?

Tra i lieviti alcoolici per cui si verifica l'autoimpedimento figura lo *Pseudosacch. apiculatus*. Il De Rossi (2) ritiene che il precoce arresto della fermentazione di questo lievito dipenda dall'azione che su di esso esercitano i prodotti del suo ricambio materiale. L'alcol e lo stesso acido carbonico ostacolano fortemente la moltiplicazione di *Pseudosacch. apiculatus*, esso produce inoltre, come è noto, quantità notevoli di acidi volatili; nel formarsi e nel relativo accumulo di questi prodotti risiederebbe perciò la causa dell'estinguersi precoce della fermentazione. Questo concetto ha però subito nel tempo una restrizione, tanto che nel campo tecnico è convinzione diffusa che l'alcol etilico sia il principale fattore limitante della fermentazione del lievito apiculato, basata, questa convinzione, sul fatto che nella fermentazione vinaria lo *Pseudosacch. apiculatus* inizia praticamente da solo la fermentazione, mentre trascorsi i primi stadi, quando il tenore alcoolico raggiunge o di poco supera il 4 - 4,5 %, la sua attività si arresta per essere rimpiazzata da quella dei tipici saccaromiceti.

L'ammettere che l'alcol etilico, per il fatto di un suo modesto accumulo nella misura del 4-5% in volume, possa essere la causa dell'arresto della fermentazione di un lievito alcoolico, non è, dal punto di vista enzimologico, cosa di poco momento. Essa equivale infatti, in sostanza, a dire che nello *Pseudosacch. apiculatus* esiste un sistema zimasiaco costituzionalmente diverso da quello dei tipici saccaromiceti; possibilità, questa, che non vo-

gliamo nè possiamo escludere, dato che non è dimostrato che il tipo di sistema zimastico del *Sacch. cerevisiae* (l'unico sino ad ora completamente indagato) abbia valore di sistema zimastico universale, ma che prima di essere accettata con tutte le sue prevedibili conseguenze di carattere enzimologico generale, esige ben più larga documentazione. Valeva quindi la pena di prendere in esame il fenomeno di autoimpedimento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* da un punto di vista più strettamente chimico-enzimologico di quanto non fosse stato fatto sino ad ora. Ed ecco un primo gruppo di risultati della sperimentazione, intrapresa.

Se la fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* anzichè su mosto d'uva naturale, e quindi acido, (pH 3-3,5) si fa svolgere su mosto leggermente alcalinizzato mediante aggiunta di un eccesso di CaCO_3 , la quantità di alcol che può essere prodotta da questo lievito aumenta considerevolmente. Operando su mosto col 18 % circa di zucchero si può giungere ad un tenore in alcol del 9 % in volume; mentre sullo stesso mosto non addizionato di CaO_3 il tenore in alcol è appena del 6,4 %. L'aggiunta di CaO_3 è quindi in grado di *sbloccare parzialmente la fermentazione dall'autoimpedimento che normalmente la limita*. Ma questo non è tutto. Contemporaneamente all'aumento della quantità di zucchero fermentato e della quantità di alcol prodotto si nota altresì un innalzamento del rendimento fermentativo. Mentre infatti nella fermentazione sul mosto naturale, acido, la resa in alcol rispetto allo zucchero fermentato è sempre nettamente inferiore al teorico, nella fermentazione in presenza di CaCO_3 essa aumenta, raggiungendo praticamente il valore che si calcola in base alla equazione classica della fermentazione.

Nelle condizioni suddette lo sbloccamento fermentativo è soltanto parziale. Circa 2/3 soltanto dello zucchero presente nel mosto vengono fermentati. Se però anzichè su mosto semplicemente addizionato di CaCO_3 la fermentazione si fa decorrere su mosto il quale sia prima neutralizzato con KOH e poi addizionato di un eccesso di CaCO_3 (col quale trattamento si raggiunge lo scopo di tamponare meglio la reazione debolmente alcalina del mosto stesso) lo sbloccamento fermentativo diventa pressochè totale. Operando su mosto col 21,45 % di zucchero fermentescibile si ottiene la fermentazione di g. 20,55 di zucchero e un tenore alcolico del 10 % in volume. Contemporaneamente, cioè, il rendimento si riabbassa rispetto al teorico.

Queste due constatazioni sperimentali sono oltremodo interessanti. Risulta da esse come lo *Pseudosacch. apiculatus* possa, in opportune condizioni di substrato, produrre quantità di alcol assai cospicue, che giungono almeno sino al 10 % in volume. Dal che scaturiscono due importanti conseguenze: la prima che contrariamente a quanto generalmente si crede, l'alcol non è tra i fattori limitanti della fermentazione di questo lievito apiculato; la seconda che il precoce arresto della fermentazione non può essere imputato alla presenza nello *Pseudosacch. apiculatus* di un sistema zimastico incompleto o comunque diverso da quello dei tipici saccaromiceti.

Il fatto che in mosto acido la fermentazione si arresti a un certo stadio, mentre in presenza di CaCO_3 essa va considerevolmente oltre, potrebbe far pensare all'intervento di un'azione neutralizzante, o fors'anche precipi-

tante, esercitantesi su qualche prodotto acido della fermentazione, prodotto che sarebbe pertanto la causa dell'autoimpedimento. Ma è evidente la insufficienza di questa interpretazione. Perché mai, infatti, lo sbloccamento è allora soltanto parziale? Perché l'allontanamento o la neutralizzazione del prodotto o dei prodotti acidi impedenti, non raggiunge l'effetto di sciogliere per intero dal suo vincolo l'azione fermentativa? Dei due casi, l'uno: o questi prodotti di natura acida non sono i soli fattori dell'impedimento, oppure le cause di questo vanno per interno cercate altrove.

Ma vediamo come vanno le cose sul mosto neutralizzato dapprima con KOH e poi addizionato di un eccesso di CaCO_3 . La fermentazione, come s'è detto, va in queste condizioni assai oltre che non in presenza di solo CaCO_3 . Ma che cosa c'è di mutato nell'una rispetto all'altra di queste due condizioni di fermentazione?

Sia nell'una che nell'altra l'azione neutralizzante o precipitante attribuibile al CaCO_3 è in grado di esplicarsi, non è quindi in quest'azione che è da ricercarsi il fattore differenziante, questo non può che risiedere *nel valore della concentrazione idrogenionica*. Mentre infatti in presenza di solo CaCO_3 il pH del substrato è scarsamente stabilizzato così che per effetto dell'acidità di fermentazione (acido carbonico compreso) esso si abbassa considerevolmente, nel mosto addizionato di CaCO_3 previa neutralizzazione, il tamponamento essendo assai più efficace, questa discesa del pH non si verifica che in più ristretti limiti. E' quindi il fattore pH del substrato che entra in giuoco quale determinante dell'impedimento e, rispettivamente, dello sbloccamento fermentativo. Ma è evidente che il pH non può entrare in giuoco come fattore diretto; che cioè la causa del precoce arresto della fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* non può risiedere in un valore critico della concentrazione in joni H del substrato. Se così fosse, come spiegare che nel mosto naturale (pH = 3 : 3,5) la fermentazione si inizia normalmente? Il pH agisce evidentemente come fattore indiretto; cioè come determinante di particolari indirizzi di fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus*. Secondo quale meccanismo?

Si potrebbe pensare che nel mosto naturale (acido) il processo di fermentazione alcolica dello *Pseudosacch. apiculatus* segua un indirizzo diverso da quello normale; che esso proceda cioè, ad esempio, attraverso un chimismo intermedio differente da quello che è proprio della fermentazione alcolica dei tipici saccaromiceti. In altri termini che la fermentazione dello *Pseudosacch. apiculatus* in mosto d'uva naturale sia una *fermentazione deviata* a indirizzo ossidativo che in quanto tale essa porti al graduale accumulo di qualche prodotto di natura acida, che a un certo punto blocca l'ulteriore avanzamento della fermentazione. Questa supposizione non ci sembra però fondata. Il sistema zimasico dei lieviti alcolici agisce, come è noto, con fisionomia normale su substrato acido, ed è con l'alcalinizzazione che si ottiene il deviamiento verso quel tipo di fermentazione ossidativa che è la terza fermentazione di Neuberg. Saremmo qui per la prima volta di fronte a un caso di deviazione ossidativa della fermentazione alcolica in ambiente acido e pel solo fatto di un valore abnormemente elevato della concentrazione in joni H. Ammissione piuttosto azzardata e che tra l'altro implicherebbe sempre la conclusione che nello *Pseudosacch. apiculatus* sia

presente un sistema zimatico diverso da quello paradigmatico del *Sacch. cerevisiae*.

L'influenza della concentrazione in joni H sull'orientamento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* deve essere altrimenti intesa. Se partiamo dal fatto, da tempo sperimentalmente accertato, che lo *Pseudosacch. apiculatus* è particolarmente sensibile all'azione degli acidi, e che esso gode altresì della facoltà di attaccare e demolire gli acidi organici del mosto d'uva, facoltà questa che può appunto fisiologicamente intendersi come un meccanismo di difesa dall'acidità eccessiva, è logico ammettere che nel mosto d'uva naturale (acido) lo *Pseudosacch. apiculatus* dia luogo a due distinti processi di fermentazione: l'uno dovuto al suo normale sistema zimatico e che porta alla fermentazione alcolica dello zimozucchero, l'altro di carattere ossidativo e dovuto ad altre attività enzimatiche, gravante solo in piccola parte sullo zucchero (*) ed essenzialmente sugli acidi organici del mosto. Questo secondo processo rappresenta per il lievito apiculato una difesa contro l'acidità eccessiva del mosto e il suo manifestarsi non ha nulla a che vedere con l'attività zimastica; esso è però tale da interferire, coi suoi prodotti, sull'andamento del processo di fermentazione alcolica. E' ad esso che si deve la formazione del prodotto, o dei prodotti, che a un certo punto determinano l'arresto dell'attività zimastica. La fermentazione alcolica dello *Pseudosacch. apiculatus* non si arresta precocemente perchè uno dei suoi prodotti accessori finali o intermedi la blocca lungo il suo decorso, ma si arresta perchè bloccata dal prodotto o dai prodotti di un altro processo fermentativo che si svolge collateralmente ad essa.

Nel mosto addizionato di CaCO_3 , il processo fermentativo collaterale non ha più luogo, in quanto non più fisiologicamente necessario, oppure si svolge più lento, o forse anche secondo un diverso indirizzo; se ne ha, comunque, come conseguenza, che l'attività zimastica non è più ostacolata, e che lo zucchero fermenta in maggior copia mentre si accresce anche il rendimento fermentativo. Ciò avviene però soltanto sino a che persista un certo grado di alcalinità; poichè non appena l'acidità di fermentazione è tale da riabbassare il pH oltre un certo limite, il processo fermentativo collaterale riprende e il fenomeno di impedimento della fermentazione alcolica si rimanifesta. Si spiega con ciò come in presenza di CaCO_3 lo sbloccamento sia soltanto parziale.

Nel mosto neutralizzato con KOH e successivamente addizionato di CaCO_3 , il tamponamento è più energico, l'acidità di fermentazione non riesce che verso gli ultimi stadi fermentativi a riabbassare il pH al disotto del limite critico e in conseguenza di ciò lo sbloccamento fermentativo è pressochè totale. Il fatto che in queste condizioni il rendimento della fermentazione alcolica sia molto inferiore al teorico trova la sua evidente spiegazione in un parziale intervento della terza forma di fermentazione di Neuberg, in relazione all'alcalinità del substrato.

(*) Che questo processo ossidativo collaterale oltre che sugli acidi organici del mosto gravi sullo zucchero è in accordo col fatto del minor rendimento in alcol che in queste condizioni si osserva.

I fatti da me osservati sino ad ora nei riguardi del fenomeno di auto-impedimento fermentativo dello *Pseudosacch. apiculatus* si lasciano logicamente inquadrare nella interpretazione di cui sopra. L'indagine ulteriore, già in corso, dimostrerà sino a che punto essa si accordi col complesso di manifestazioni che costellano il fenomeno principale. Sin da ora resta ad ogni modo accertato che l'alcol etilico non è tra i fattori limitanti dell'attività fermentativa dello *Pseudosacch. apiculatus*. Constatazione, questa, di assai notevole significato sia perchè dimostra infondata un'opinione diffusa e che teoricamente avrebbe dovuto portare al sovvertimento di molti radicati concetti di zimologia, sia perchè riapre, dal punto di vista zimotecnico, il problema dei limiti entro cui racchiudere la cooperazione fermentativa dello *Pseudosacch. apiculatus* nella fermentazione abituale del mosto d'uva. Dimostrato, come ora è dimostrato, che l'alcol non è di per sè fattore inibente dell'attività fermentativa di questo lievito, non si può escludere che, in associazione con altri lieviti capaci di rimuovere il fattore o i fattori di impedimento, esso possa mantenersi attivo anche sino agli ultimi stadi della fermentazione.

ESPERIENZE E RISULTATI

Le esperienze vennero in parte compiute su mosto d'uva bianca contenente il 17,90 % di zucchero, espresso come invertito, e con una acidità totale, espressa come acido tartarico, pari al 9,25 per mille; in parte su mosto a maggior tenore in zucchero (21,45 %) ottenuto per concentrazione del primo.

In tutte le esperienze la fermentazione si svolse a 20°C.

Ciascun gruppo di risultati (zucchero-alcol) si riferisce a esperienze singole condotte in beute della capacità di circa 300 cc. contenenti ciascuna cc. 150 di mosto sterile che veniva successivamente seminato con un'ansata di lievito (*). A tempi diversi dall'inizio della fermentazione una delle prove veniva interrotta per l'analisi eseguita, quest'ultima, secondo i metodi consueti: zucchero col Fehling, alcol per distillazione. Il carbonato di calcio veniva sterilizzato sia prima che dopo l'aggiunta al mosto.

RIASSUNTO

Si dimostra che il precoce arresto della fermentazione dello *Pseudosaccharomyces apiculatus* (fenomeno che viene definito come *autoimpedimento fermentativo*) non è direttamente imputabile all'azione paralizzante o depressiva dell'alcol etilico. In condizioni opportune di substrato il detto lievito può dare, per quanto sino ad ora accertato, sino al 10% di alcol in volume:

(*) Di coltura pura (*Pseudosaccharomyces apiculatus* - stipse 5 dell'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica della R. Università di Perugia), cortesemente fornito dal Collega Prof. Castelli che ringraziamo.

ANDAMENTO DELLA FERMENTAZIONE CON PSEUDOSACCH. APICULATUS IN DIVERSI SUBSTRATI

Substrato: mosto d'uva naturale zucchero 17,90 %				Substrato: mosto d'uva + CaCO ₃ zucchero 17,90 %				Substrato: mosto d'uva + KOH + CaCO ₃ zucchero 21,45 %			
Tempo dall'inizio della fermentazione		alcol % in volume		Tempo dall'inizio della fermentazione		alcol % in volume		Tempo dall'inizio della fermentazione		alcol % in volume	
calco- lato	trovato	calco- lato	trovato	calco- lato	trovato	calco- lato	trovato	calco- lato	trovato	calco- lato	trovato
30 ore	4,20	2,70	2,40	48 ore	5,10	3,30	3,20	48 ore	1,95	1,25	0,80
3 giorni	5,40	3,45	3,05	4 giorni	9,15	5,90	5,80	7 giorni	6,70	4,30	3,30
10 giorni	8,55	5,50	5,20	7 giorni	11,65	7,50	7,35	20 giorni	11,10	7,05	5,40
15 giorni	12,05	7,75	6,50	10 giorni	13,75	8,85	8,70	45 giorni	20,55	13,20	10,00
20 giorni	11,90	7,50	6,40	15 giorni	14,05	9,05	8,80				

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird bewiesen dass die frühzeitige Hemmung der Gärung des *Pseudosaccharomyces apiculatus* (Erscheinung, welche als selbständiges Gärungshindernis definiert wird) nicht direkt der lähmenden oder hindernden Wirkung des Aethylalkohols zuzuschreiben ist. Bei zweckmässigen Bedingungen des Substrates, ist dieser Gärstoff, nach den bisherigen Feststellungen imstande bis 10 % Alkohol zu bilden.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *C. Antoniani* - Sul fenomeno di autoimpedimento fermentativo e sulle cause atte a rimuoverlo. Osservazioni sul genere *Hansenula*. (Boll. Soc. Ital. di Biol. Sperim., in corso, di pubblicazione).
- *Idem, idem*. Osservazioni su *Pseudosaccharomyces apiculatus*. (Ibidem).
- (2) *G. De Rossi* - *Microbiologia Agraria e Tecnica*, pag. 472 (1927).