



ACCADEMIA ITALIANA DELLA VITE E DEL VINO
SIENA

GRUPPO DI LAVORO SUI LIEVITI DI INTERESSE ENOLOGICO

CONVEGNO

**BIOTECNOLOGIE IN ENOLOGIA:
I LIEVITI SELEZIONATI**



27 - 28 GIUGNO 1988

SALA CONFERENZE: Via Meravigli, 9 b - MILANO
CAMERA DI COMMERCIO - INDUSTRIA
ARTIGIANATO - AGRICOLTURA

IL CONSUMO DI ACIDO L-MALICO DA PARTE DI
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

A. Gandini, V. Gerbi, G. Zeppa

Istituto di Microbiologia ed Industrie agrarie
dell'Università di Torino

PREMESSA

Un giusto livello di acidità è uno dei requisiti essenziali per la caratterizzazione di un vino di qualità.

L'acidità del vino, come ben noto, è condizionata anzitutto da quella dell'uva, la quale, per ragioni varietali, climatiche o di andamento stagionale, non risulta sempre tale da fornire prodotti armonici. Nel caso dei vini, specialmente rossi, delle zone temperato-fredde la causa principale va ricercata nel tenore eccessivo in acido malico, dal caratteristico sapore acerbo ed aggressivo.

La disacidificazione microbiologica, pur presentando rispetto a quella chimica certi vantaggi, pone d'altro canto non pochi problemi, relativi alle difficoltà di realizzazione, nel caso del ricorso ai batteri malolattici, alle quali si può aggiungere l'influenza per lo più non favorevole sulle caratteristiche organolettiche del vino, qualora si impieghino lieviti del genere Schizosaccharomyces, capaci di degradare totalmente l'acido malico.

In effetti, come ha dimostrato Usseglio-Tomasset (1985), una fermentazione maloalcolica completa causa nella struttura acida del vino nonchè sul suo potere tampone uno squilibrio tanto più profondo quanto più elevati sono i tenori di acido malico di partenza.

Sulla base di una esperienza ormai venticinquennale ci sentiamo di proporre l'impiego, per la vinificazione di uve troppo ricche di acido malico, di stipti di Saccharomyces cerevisiae opportunamente selezionati, predisponendo, ovviamente, condizioni propizie alla loro attività.

Il poter ridurre l'acidità malica già nel corso della fermentazione alcolica può costituire un risultato interessante, soprattutto in vista dell'elaborazione di vini di pronto consumo, oggi particolarmente richiesti, nonchè per agevolare,

Lavoro effettuato con il contributo della Regione Piemonte

qualora risulti ancora auspicabile, la disacidificazione batterica, per l'avvio della quale proprio l'elevata acidità costituisce uno degli ostacoli più rilevanti.

Osothsilp e Subden (1986) hanno accertato che in condizioni aerobiche diversi ceppi di Saccharomyces cerevisiae, dopo aver esaurito il glucosio, sono in grado di utilizzare il malato come unica fonte di carbonio e di energia.

Tuttavia per l'industria enologica è, ovviamente, di ben maggiore interesse la capacità dei lieviti di degradare, in anaerobiosi, il malato ad alcol etilico ed anidride carbonica.

Sul meccanismo della fermentazione maloalcolica, che prevede, quale intermedio, l'acetaldeide, hanno riferito recentemente Manachini, Maconi ed Aragozzini (1988), al cui esauriente contributo rimandiamo chi fosse interessato ad approfondire l'argomento.

Qui basterà ricordare che la possibilità di metabolizzare il malato e la velocità delle successive reazioni di trasformazione sono alquanto variabili nell'ambito specifico in quanto dipendono sia dal sistema di trasporto di cui dispone il ceppo di lievito per introdurre il malato nella cellula, sia dagli enzimi coinvolti negli stadi iniziali di questo processo metabolico e dalla loro affinità per il substrato.

Secondo Baranowski e Radler (1984) in Sacch. cerevisiae il superamento delle barriere cellulari da parte del malato avviene per semplice diffusione: tale tipo di trasporto è notoriamente poco efficiente, tanto che viene imputata a questa circostanza la ridotta capacità di molti stiptiti della specie in parola di degradare l'acido malico.

Per altri ceppi di Sacch. cerevisiae Fuck, Stärk e Radler (1973) hanno invece prospettato che le ridotte capacità di metabolizzare il malato debbano essere correlate soprattutto alla bassa affinità per il substrato del loro enzima malico.

Dalle numerose indagini a carattere enologico che hanno fatto seguito a quella pubblicata da Peynaud nel 1938 (citiamo, fra le altre, quelle di Peynaud e Sudraud (1964), Gandini e Tarditi (1966), Rankine (1966), Tarantola e Gandini (1967), Fuck e Radler (1972), Gaia (1979), Delfini e Ciolfi (1980), Fatichenti, Farris, Deiana e Ceccarelli (1984)) sono risultati, da parte dei Saccharomyces usuali agenti della fermentazione alcolica, consumi di acido malico variabili da valori praticamente irrilevanti ad oltre il 50%, che, in mosti iperacidi, risultano di indubbia incidenza organolettica e tecnologica.

Ancora lo scorso anno abbiamo messo a confronto il comportamento, nei confronti dell'acido l-malico, di un certo numero di isolati della megaspecie Saccharomyces cerevisiae di varia provenienza, in condizioni diverse di temperatura, concentrazione zuccherina e tenore in tiamina.

Con lo stipite dimostratosi più attivo ci siamo successivamente proposti di saggiare l'effetto sulla fermentazione malolalcolica dell'aerazione, del pH e del tenore iniziale di acido malico del mosto.

Su detti argomenti sono già comparsi, sulla letteratura specializzata, diversi contributi sperimentali ad opera di Rankine (loc. cit.), Fuck e Radler (loc. cit.), Balloni e Florenzano (1977), Delfini e Ciolfi (loc. cit.), Vezinhet e Barre (1982), Ciolfi, Castino e Di Stefano (1985), Margheri, Versini, Pellegrini e Tonon (1986). Non sempre però i risultati cui sono pervenuti gli Autori citati risultano concordanti.

Finalmente, con i due ceppi dimostratisi in possesso di una rilevante capacità di fermentare l'acido malico abbinata a buone caratteristiche enologiche, sono state condotte alcune vinificazioni con macerazione su scala industriale.

Se infatti preliminarmente è importante sperimentare in condizioni di laboratorio, rigorosamente controllabili, successivamente è altrettanto essenziale verificare la trasferibilità dei risultati ottenuti nella pratica di cantina, quando uve, vasi vinari ed attrezzature apportano un'ineliminabile e più o meno pregevole carica microbica, le temperature non sono sempre facilmente controllabili e le stesse tecnologie di fermentazione sono necessariamente variabili.

Sono state scelte per la sperimentazione uve Barbera e Nebbiolo in quanto si tratta di vitigni importanti per l'enologia italiana in genere e piemontese in particolare, i cui mosti, specie nel caso del primo, possono presentare tenori eccessivi di acido malico.

MATERIALI E METODI

A) Prove di laboratorio

Lieviti

Nell'ambito di parecchie decine di stipiti di pregevoli proprietà enologiche, appartenenti a diverse razze fisiologiche della specie Saccharomyces cerevisiae, ne abbiamo scelti e messi a confronto nove, dei quali tre della razza fisiologica cerevisiae ed uno della r.f. bayanus allestiti in forma essiccata e cinque, di cui tre cerevisiae, un bayanus ed un uvarum, della

collezione dell'Istituto di Microbiologia ed Industrie agrarie dell'Università di Torino.

Propagati sullo stesso mosto predisposto per le varie prove, detti lieviti sono stati inoculati nella misura del 2% di mosto-coiture di 48 ore.

Substrati e modalità di incubazione

I. - Il confronto fra le capacità di degradare l'acido malico è stato effettuato su mosto conservato per filtrazione amicrobica, col 15% di zuccheri (portati al 25% in metà delle tesi), 3,20 g/l di acido tartarico, 10,75 g/l di acido malico, pH= 3,06, distribuito, in ragione di 200 ml ciascuna, in beute da 300 ml e pastorizzato.

Dopo il trattamento termico metà delle tesi ha ricevuto l'aggiunta di tiamina nella dose di 0,6 mg/l di mosto. Non conoscendo il tenore di tiamina naturalmente presente nel mosto si è operato in condizioni teoricamente criticabili: tale modo di agire non impedisce però di accertare se l'aggiunta della vitamina B₁, indipendentemente dalla quantità già esistente nel mosto, è un procedimento consigliabile. Infatti è praticamente da escludere che un tecnico in vendemmia disponga del tempo e delle attrezzature per determinare il contenuto in tiamina delle sue uve.

Infine metà delle beute di ciascun gruppo è stata incubata a 15°C, le rimanenti sono state poste a 30°C.

Dopo l'inoculo le beute sono rimaste tappate con cotone sino all'inizio della fermentazione, quindi sono state chiuse con valvola di Müller, al fine di poter seguire, mediante pesate periodiche, l'andamento del processo fermentativo.

Trascorse le prime 48 ore di fermentazione, operando in cappa sterile, si è tolta la valvola e si sono sottoposti i mosti a prolungato arieggiamento, dopo il quale è stato ripristinato il sistema di chiusura.

Al termine della fermentazione, rilevabile dalla costanza del peso dei recipienti e dalla sedimentazione della maggior parte delle cellule dei lieviti, i vini sono stati sottoposti all'analisi del titolo alcolometrico, dell'estratto secco totale, del pH, dell'acidità totale e di quella volatile, nonché dei principali acidi (malico, tartarico, acetico, succinico e d-lattico) sia per H.P.L.C. (secondo Schneider, Gerbi e Redoglia, 1987) che per via enzimatica (secondo Bergmeyer, 1974) o, il tartarico, colorimetrica secondo Vidal e Blouin (1978).

II. - Al fine di confermare l'effetto della tiamina sul metabolismo dei saccaromiceti si è altresì sperimentato, con cinque ripetizioni, il comportamento dello stipite più maloalcolico nel mezzo nutritivo sintetico proposto da Delfini e Ciolfi (1979), aggiunto di 200 g/l di glucosio, 5 g/l di acido l-malico, con o senza 0,6 mg/l di tiamina ed incubazione a 25°C.

III. - Ancora limitatamente al lievito risultato più maloalcolico sono stati controllati gli effetti dell'aerazione e del pH in un mosto con il 15% di zuccheri, 5,1 g/l di acido malico, aggiunto di 0,6 mg/l di tiamina e portato, in metà delle tesi, dal pH naturale di 3,3 a 2,7. Tali valori, nelle nostre regioni, delimitano l'intervallo di concentrazione idrogenionica nel cui ambito la demolizione dell'acido malico può essere auspicabile.

Tutte le beute sono state chiuse con valvole di Müller ed incubate a 25°C : metà vennero aperte solo in occasione dei prelievi e per il tempo necessario agli stessi, mentre le altre furono sottoposte ad arieggiamento tre volte al giorno, protratto per trenta minuti, su agitatore magnetico e in cappa a flusso laminare.

In considerazione della bassa variabilità intrinseca del carattere "demolizione dell'acido malico", dimostrata da Delfini e Ciolfi (1980), sono state effettuate due sole ripetizioni.

IV. - Infine, abbiamo condotto una prova di verifica dell'effetto del tenore iniziale di acido malico sull'entità del consumo del medesimo da parte dello stipite dimostratosi più attivo, in condizioni di relativa anaerobiosi, su mosto col 20% di zuccheri, suddiviso in tre partite. Nella prima si è lasciato il tenore in acido l-malico al suo valore naturale di 2,1 g/l, mentre nelle altre esso è stato portato a 5,2 ed a 10,2 g/l.

In metà delle beute di ciascuna tesi il pH del mosto è stato lasciato al valore raggiunto in seguito all'eventuale addizione dell'acido malico, mentre nelle restanti è stato uniformato al valore iniziale di 3,1.

Anche in questo caso si è operato in doppio ed a 25°C.

Tutti i dati sperimentali ottenuti sono stati sottoposti ad opportuna elaborazione statistica.

B) Prove di cantina.

Sono state condotte su uve Barbera e Nebbiolo, rispettivamente presso la Cantina Sociale di Vinchio e Vaglio Serra (AT) e l'enopolio CE.VIT.AS.

di Grinzane (CN), i cui presidenti e tecnici ringraziamo per la fattiva collaborazione.

L'andamento eccezionalmente caldo dell'autunno 1987, avendo provocato nelle uve un'inconsueta diminuzione dell'acidità, non è stato certo favorevole alle finalità della prova.

Nel caso del Barbera lo stato sanitario delle uve lavorate era discreto: una modesta incidenza di marciume acido ha fatto sì che il pigiato, all'atto dell'inoculo, ospitasse già $2,8 \times 10^5$ lieviti per ml, in netta prevalenza ascrivibili alla specie Candida stellata.

Pur essendo stata effettuata la raccolta con leggero anticipo (il 25 settembre), il mosto conteneva "soltanto" 4,20 g/l di acido malico, aveva un pH di 3,06, un'acidità totale di 11,3 g/l ed un tenore zuccherino del 19%.

In annate normali i mosti di Barbera piemontesi superano i 5 g/l di acido malico, ma possono arrivare a valori più che doppi.

A loro volta le uve Nebbiolo, raccolte il 9 ottobre, sane, con il 21,6% di zuccheri, un pH di 3,19, un'acidità totale di 7,7 g/l, contenevano 3,5 g/l di acido malico anziché i 4 - 6 (o più) frequenti in annate o zone meno felici.

L'analisi microbiologica del pigiato ha messo in evidenza 9×10^5 cellule di lieviti per ml, in maggioranza, anche in questo caso, del tipo C. stellata.

In ciascuna cantina abbiamo allestito, in recipienti di P.R.F.V. da 10 hl, sei tesi rappresentate dai due lieviti rivelatisi più rispondenti in laboratorio e da un testimone, ciascuno con l'aggiunta o meno di 50 mg/hl di tiamina.

Per avviarne prontamente la fermentazione le tesi testimoni sono state addizionate del 5% di mosto derivante da uve raccolte nello stesso vigneto una settimana prima e fatto fermentare spontaneamente.

Il ceppo I.M.I.A.T. 432 di Saccharomyces cerevisiae è stato propagato su mosto ottenuto dalla stessa partita di uve del precedente, preventivamente sfecciato a freddo e poi pastorizzato. Anch'esso è stato aggiunto nella misura del 5%.

Il Sacch. cerevisiae killer - I.C.V. è stato utilizzato in forma secca, nella dose di 15 g/hl, previa accurata riattivazione.

In ambedue le cantine, con partite di circa 40 quintali di uva, di cui si era curata l'uniformità, è stata allestita una massa di pigiato-diraspato, solfitato in ragione di 5 g/hl, accuratamente omogeneizzato mediante rimontaggio e poi ripartito

nei sei serbatoi. Immediatamente dopo si è proceduto all'inoculo ed all'eventuale aggiunta di tiamina.

Le varie tesi, entrate in fermentazione entro 24 ore dall'inoculo, sono state sottoposte a follature giornaliere. La temperatura, nei Barbera, è salita sino a 30°C, nei Nebbioli a 25°C.

Il Barbera è stato svinato dopo cinque giorni di macerazione, il Nebbiolo dopo otto.

Il processo di vinificazione è stato seguito analiticamente, con ovvia particolare attenzione all'evoluzione dell'acido malico, sino al completamento della fermentazione malolattica.

Dopo la stabilizzazione a freddo e l'imbottigliamento, piuttosto precoce in considerazione dello scopo delle prove, i vari vini sono stati sottoposti ad accurati esami organolettici: preliminarmente ad un test di differenza (duo-trio) e, nei casi in cui questo risultava significativo, di preferenza.

RISULTATI E LORO DISCUSSIONE

A) Prove di laboratorio

I. - Confronto fra i consumi di acido malico da parte di diversi stipiti di Saccharomyces cerevisiae

Calcolando la media dei risultati di tutte le otto beute inoculate con ciascun stipite, il potere maloalcolico dei Sacch. cerevisiae posti a confronto è risultato compreso fra il 19,3 ed il 28,4%, con singoli valori estremi del 10,6 e del 35%.

Il calo maggiore è stato provocato dal ceppo I.M.I.A.T. 432, il quale ha consumato, mediamente, oltre 3 g/l di acido malico; lo seguono due degli stipiti allestiti in forma essiccata (l'Epernay 2-Geisenheim ed il Killer-I.C.V.), mentre tutti gli altri sono risultati significativamente inferiori (Tab. 1).

Si può osservare che il mezzo impiegato in questa prova non si è dimostrato particolarmente favorevole all'estrinsecarsi della capacità maloalcolica, dal momento che lo stesso stipite 432 in altre occasioni, ed anche in una delle prove successive, ha dimostrato un potere disacidificante superiore.

Per quanto riguarda gli effetti sulla fermentazione maloalcolica della temperatura, del tenore in zuccheri e dell'aggiunta di

Tab. 1 - Degradazione percentuale dell'acido malico da parte di alcuni stipiti di Saccharomyces cerevisiae in diverse condizioni di temperatura, tenore in zuccheri ed in tiamina.

Temperatura	15 °C				30 °C				Media (P=0.01)
	15		25		15		25		
	si	no	si	no	si	no	si	no	
Zuccheri %									
+ Tiamina									
<i>S.f. cerevisiae</i> I.M.I.A.T. 432	25.11	23.35	33.36	34.98	26.53	24.67	32.88	26.71	28.40 A
<i>S.f. cerevisiae</i> Epernay 2-Geisenh.	28.10	20.37	26.07	24.37	30.25	27.55	25.96	24.09	25.85 AB
<i>S.f. cerevisiae</i> Killer I.C.V.	22.51	21.11	26.64	24.36	26.62	24.57	30.79	23.68	25.04 AB
<i>S.f. bayanus</i> Champagne-Pasteur	21.95	20.75	25.59	25.31	23.37	25.79	22.64	24.16	23.70 BC
<i>S.f. cerevisiae</i> I.M.I.A.T. 482	20.00	20.75	22.28	19.63	25.97	24.58	28.43	27.00	23.57 BC
<i>S.f. bayanus</i> I.M.I.A.T. 173	19.53	19.16	26.07	20.20	20.95	20.86	28.33	23.78	22.36 BC
<i>S.f. uvarum</i> I.M.I.A.T. 409	22.98	18.60	26.07	23.99	18.72	18.72	24.25	21.88	21.90 BC
<i>S.f. cerevisiae</i> Montrach.Davis 522	19.82	19.16	20.67	18.59	24.84	22.60	23.78	23.49	21.62 BC
<i>S.f. cerevisiae</i> Castelli 20	16.74	10.61	20.29	18.96	22.44	17.23	23.49	25.01	19.35 C

vitamina B₁, saggiati tutti a due livelli nei confronti di nove Sacch. cerevisiae l'elaborazione statistica dei dati analitici ha consentito interessanti osservazioni.

L'effetto più vistoso (P= 0,01) è risultato quello degli zuccheri, a conferma dei reperti di Delfini e Ciolfi (1980), i quali, sperimentando con altri saccaromiceti, hanno dimostrato che la degradazione dell'acido malico è funzione lineare della fermentazione alcolica.

Alla luce di questi risultati l'eventuale arricchimento di un mosto può consentire, come effetto collaterale, una maggior demolizione dell'acidità malica da parte dei Saccharomyces cerevisiae.

Anche se con minore livello di significatività (P= 0,05), è risultato che sia la temperatura di fermentazione più elevata (30 rispetto a 15°C) che l'aggiunta di tiamina stimolano la fermentazione malcolcolica.

Invero già Carre, Lafon-Lafourcade e Bertrand, nel 1983, hanno segnalato che la tiamina, in quanto parte integrante della cocarbossilasi, accelera la demolizione dell'acido malico da parte di certe specie di lieviti. Tale effetto non è invece stato riscontrato da Margheri, Versini, Pellegrini e Tonon (1986).

Da queste prove è ancora emerso che la vitamina B₁ non ha influenzato significativamente il potere alcoligeno dei saccaromiceti in esame mentre ha determinato un aumento significativo dell'acido succinico, verosimilmente derivante dalla decarbossilazione dell'acido alfa-chetoglutarico. Inoltre nei fermentati aggiunti di tiamina abbiamo riscontrato un'acidità volatile mediamente superiore del 50% rispetto a quella delle tesi non addizionate (Fig. 1).

II. - Effetto della tiamina

La prova sull'effetto della tiamina, condotta su mezzo sintetico ha confermato le indicazioni emerse in quella precedente, facendo registrare in particolare:

- l'azione acceleratrice della vitamina B₁ sulle fasi iniziali della fermentazione alcolica;
- una demolizione dell'acido malico superiore di 0,42 g/l (del 38,7 contro il 30,4%);
- una fortissima riduzione del tenore in acido piruvico (32 invece dei 207 mg/l del testimone privo di tiamina);
- un dimezzamento del quantitativo di acido

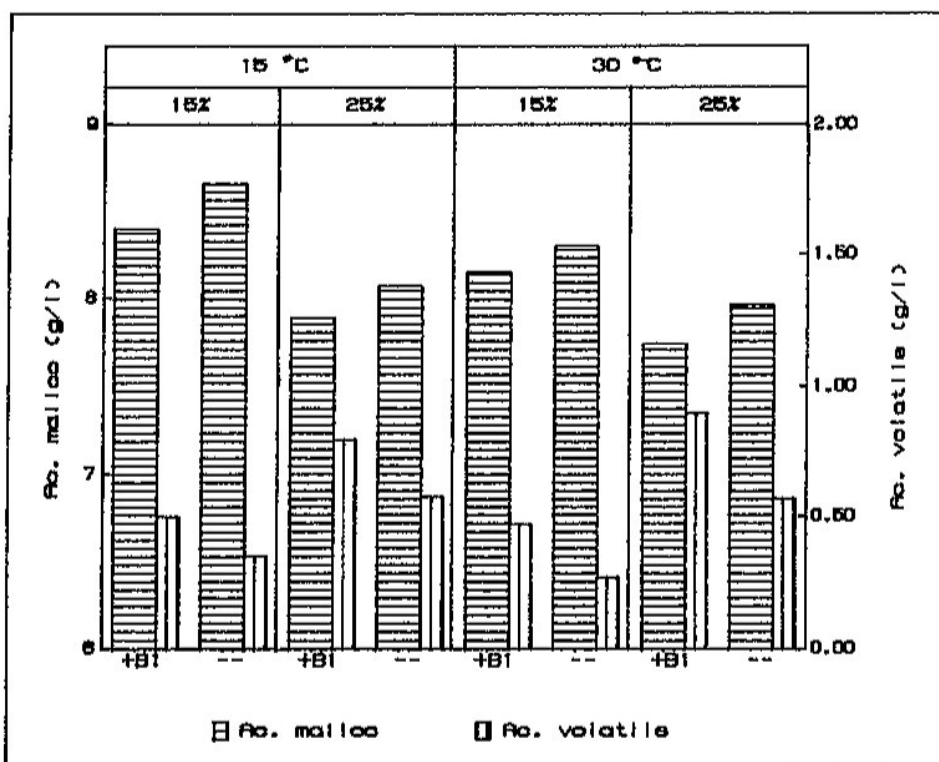


Fig. 1 : Effetto dell'aggiunta di tiamina sulla demolizione di acido malico e sulla produzione di acidità volatile:

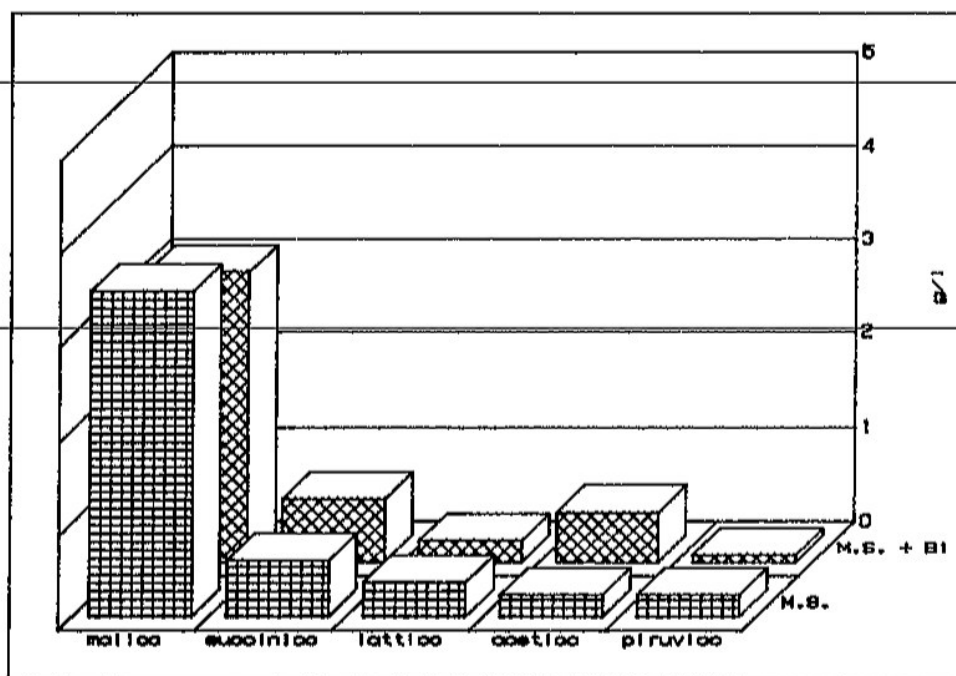


Fig. 2 : Effetto della presenza di tiamina sul metabolismo di alcuni acidi organici da parte di *Saccharomyces cerevisiae* I.M.I.A.T. 432 in mezzo sintetico.

- lattico (208 anzichè 403 mg/l);
- un leggero (0,1 g/l) aumento dell'acido succinico (fig. 2).

Nel complesso l'acidità totale del mezzo in presenza di tiamina è diminuita di 9 meq/l ed il pH è aumentato di 0,16 unità.

Mentre gli effetti sopraccitati risultano ampiamente documentati, sono invece scarse e contrastanti le indicazioni della letteratura sull'azione della tiamina sull'acidità volatile dei vini. Lafon-Lafourcade e Coll. (1975) affermano che i vini liquorosi ottenuti con aggiunta di tiamina presentano acidità volatili più basse, mentre Delfini e Cervetti (1987) segnalano incrementi (sino a 0,1 g/l) rispetto alle tesi non aggiunte.

In questa nostra prova i fermentati in presenza di tiamina hanno fatto registrare un'acidità volatile superiore di 0,24 g/l (pari al 67%) rispetto ai testimoni.

Facendo riferimento al solo acido acetico, l'incremento in valore assoluto è dello stesso ordine, ma percentualmente supera il 100%. L'origine di detto acido sarebbe da ricondurre all'acido piruvico, che verrebbe decarbossilato ad acetaldeide: siccome questa non si accumula (anzi, nel mezzo sintetico senza tiamina ne abbiamo dosato 80 mg/l contro i 55 del mezzo con tiamina) è ipotizzabile che venga trasformata in acido acetico. Oppure l'acido piruvico può dar luogo alla formazione di acetil-coenzima A il quale, per idrolisi, fornirebbe acido acetico.

Questo effetto, seppure non generalizzabile, in considerazione dell'interazione fra stipite e substrato, contrasta quello positivo sulla demolizione dell'acido malico e ci rende per il momento perplessi nel consigliare l'aggiunta di vitamina B₁ ai mosti per favorirne la disacidificazione.

III. - Effetti dell'aerazione e del pH sulla degradazione dell'acido malico (Fig. 3)

L'arieggiamento periodico del mosto in fermentazione ha consentito al *Sacch. cerevisiae* I.M.I.A.T. 432 un consumo dell'acido malico del 41% contro il 35% rilevato in relativa anaerobiosi.

E' stata confermata l'affermazione di Fuck e Radler (1972) secondo i quali la demolizione dell'acido malico è proporzionale alla massa cellulare e pertanto favorita dall'aerazione. Il volume di biomassa nella serie arieggiata è risultato quasi doppio rispetto a quello della serie non arieggiata.

Ac. malico degradato (g/l)

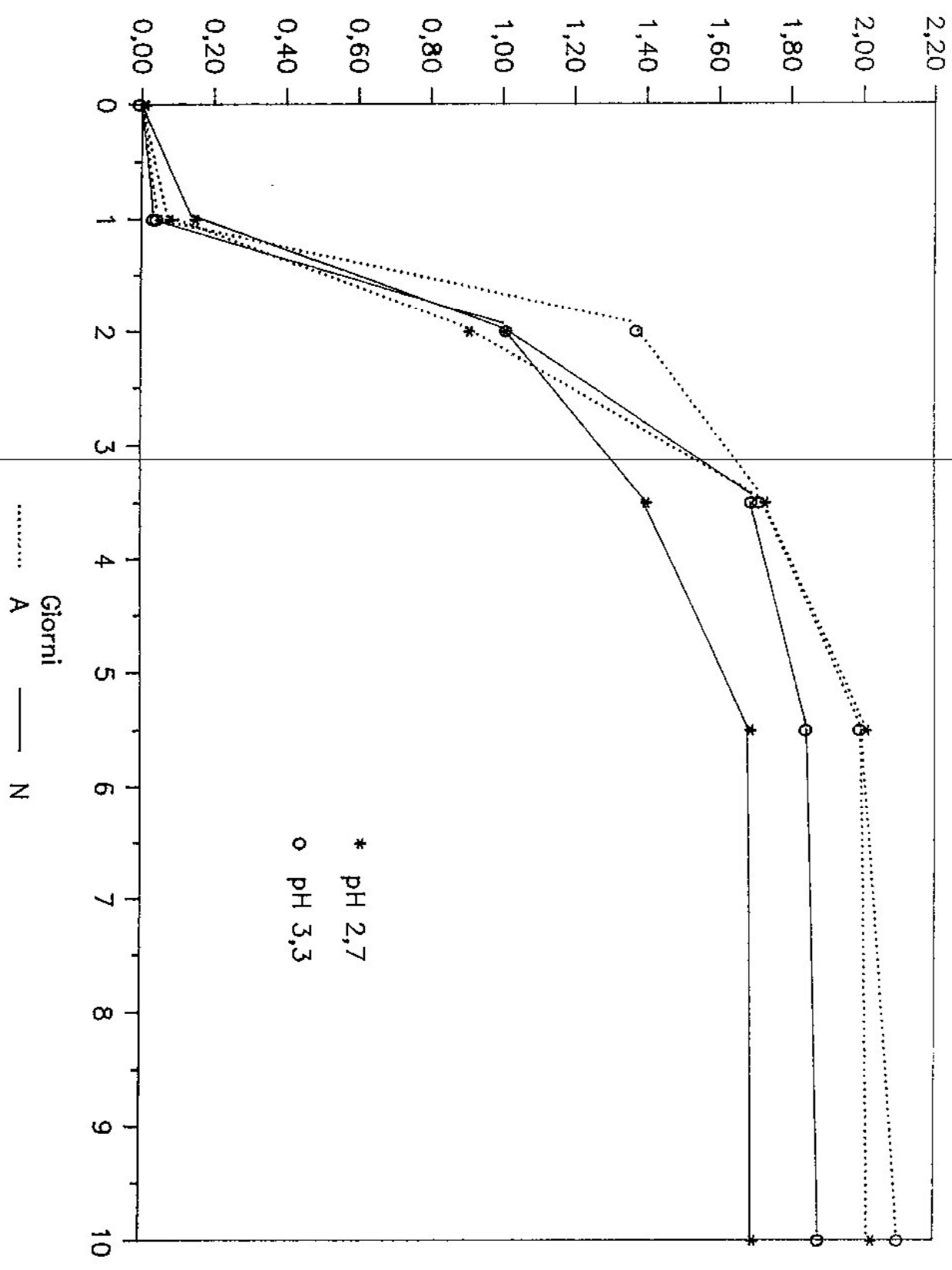


Fig. 3 : Consumo di acido malico da parte di *Saccharomyces cerevisiae* I.M.I.A.T. 432 in diverse condizioni di aerazione e di pH. (A= aereggiamento periodico; N= anaerobiosi)

La concentrazione idrogenionica si è dimostrata senza influenza, nei limiti sperimentati, nelle tesi arieggiate mentre in anaerobiosi a pH 2,7 si è verificato un minor abbattimento di circa il 3%, statisticamente significativo rispetto a quello registrato a pH 3,3.

Con questa prova si è ribadito che l'andamento della fermentazione dell'acido malico è analogo a quello della fermentazione degli zuccheri e che la disacidificazione si realizza soprattutto, a temperature comprese fra i 20 ed i 25°C, nei primi cinque-sei giorni di fermentazione, in condizioni ipossiche ed in presenza di elevate concentrazioni di fonti di carbonio e di energia.

IV. - Effetto del tenore iniziale di acido malico

In sintonia con la maggioranza dei reperti sinora pubblicati (fanno eccezione Wagner, Kreutzer e Mahlmeister, 1986) il Sacch. cerevisiae 432 ha fatto registrare un abbattimento percentuale sostanzialmente analogo (dell'ordine del 35%) in presenza di 2 oppure 5 g/l di acido malico nel mosto, mentre se il contenuto era di 10 g/l la percentuale di attacco è risultata inferiore di circa il 5%, valore significativo, ma non tale da impedire di affermare che, nel campo di concentrazioni normalmente riscontrabili nei nostri mosti, la percentuale di degradazione dell'acido malico è relativamente costante.

Le variazioni di pH conseguenti ai diversi tenori di acido malico (2.7, 2.9 e 3.1) non hanno esercitato un effetto sensibile sul potere maloalcolico del lievito in esame.

B) Prove di cantina

Nelle prove condotte su Barbera (Tab. 2), nonostante la carica blastomicetica apportata dalle uve, i due lieviti inoculati hanno esplicato una buona azione disacidificante. Il ceppo 432 è stato ancora una volta il migliore, con una riduzione di oltre il 34% del tenore in acido malico contro il 27,5% del Killer-I.C.V. ed il 21,5% del testimone.

In termini di pH il vantaggio è stato esiguo, dell'ordine di pochissimi centesimi, probabilmente in conseguenza della maggior incidenza dell'acido tartarico, presente in misura più che doppia rispetto al malico, sulla concentrazione idrogenionica.

Nel Nebbiolo (Tab. 3), pur risultando, rispetto al Barbera, percentualmente minore (27%), la degradazione dell'acido malico da parte del

Tab. 2 - Caratteristiche analitiche dei Barbera alla svinatura.

	T	T+B ₁	C	C+B ₁	K	K+B ₁
Alcol % vol.	10.87	10.87	10.83	10.87	10.78	10.78
Ac. totale g/l	11.4	11.7	10.7	10.5	11.5	11.4
Ac. volatile g/l	0.21	0.24	0.27	0.24	0.33	0.34
pH	3.02	3.01	3.04	3.05	3.03	3.02
Ac. tartarico g/l	6.89	7.61	6.77	7.00	6.55	6.90
Ac. l-malico g/l	3.27	3.23	2.71	2.67	3.05	3.04
Calo % ac. malico	21.2	22.1	33.9	34.8	27.4	27.6
Ac. l-lattico g/l	-	-	-	-	-	-

Legenda: T = testimone con mosto d'avviamento spontaneo
 C = Sacch. cerevisiae I.M.I.A.T. 432
 K = Sacch. cerevisiae Killer-I.C.V.

Tab. 3 - Caratteristiche analitiche dei Nebbiolo alla svinatura.

	T	T+B ₁	C	C+B ₁	K	K+B ₁
Alcol % vol.	12.78	12.55	12.87	12.82	12.82	12.78
Ac. totale g/l	8.77	8.62	7.50	7.35	8.02	8.10
Ac. volatile g/l	0.23	0.20	0.22	0.22	0.22	0.22
pH	3.28	3.29	3.37	3.37	3.34	3.36
Ac. tartarico g/l	3.36	3.45	3.35	3.22	3.47	3.70
Ac. l-malico g/l	3.30	3.24	2.57	2.57	3.08	3.14
Calo % ac. malico	7.8	9.5	27.4	27.4	13.9	12.3
Ac. l-lattico g/l	-	-	-	-	-	-

Legenda: T = testimone con mosto d'avviamento spontaneo
 C = Sacch. cerevisiae I.M.I.A.T. 432
 K = Sacch. cerevisiae Killer-I.C.V.

ceppo 432 è stata di ben tre volte maggiore rispetto a quella operata dalla blastoflora spontanea ed ha comportato un aumento di pH di quasi un decimo.

La costante assenza di acido l-lattico conferma che la degradazione dell'acido malico è esclusivamente da attribuire all'azione dei lieviti e non anche a batteri lattici.

A livello di prove di cantina l'aggiunta di tiamina non ha manifestato alcun effetto sull'entità della fermentazione alcolica nè sulla produzione di acidità volatile: verosimilmente la naturale dotazione delle uve era sufficiente a coprire le esigenze dei lieviti.

Sia nei Barbera che nei Nebbiolo, conservati alla temperatura di 18°C, le tesi fermentate dal Saccharomyces cerevisiae 432 sono state le prime ad iniziare ed a concludere la fermentazione malolattica (Tab. 4).

Tab. 4 - Giorni intercorsi dalla svinatura al completamento della fermentazione malolattica nei vini ottenuti dalle tre tesi a confronto.

TESI	Barbera	Nebbiolo
Testimone	41	60
<u>Sacch. cerevisiae</u> 432	35	43
<u>Sacch. cerevisiae</u> K-I.C.V.	45	60

Si può osservare che nel caso del Barbera, in accordo a quanto lasciava prevedere il modestissimo innalzamento del pH, il vantaggio conseguito fermentando con il ceppo I.M.I.A.T. 432 sia stato di soli sei giorni. Nel caso del Nebbiolo si è avuta invece una riduzione di circa un terzo del tempo di attesa.

Tale possibilità di accelerare il compimento della disacidificazione batterica è un risultato che riteniamo di notevole interesse in vista della produzione, in tempi brevi, di vini armonici e, nel contempo, biologicamente stabili.

L'elaborazione dei risultati delle degustazioni ha prospettato un maggior gradimento per i vini ottenuti con il ceppo più maloalcolico. Prima di trarre conclusioni definitive riteniamo necessaria almeno un'ulteriore serie di prove, auspicabilmente con uve con tenori maggiori di acido malico.

RINGRAZIAMENTI. Gli autori esprimono la loro viva gratitudine al dott. spec. José Luis Minati per la preziosa collaborazione tecnica.

RIASSUNTO

E' stata verificata, sia in prove di laboratorio che in vinificazioni in rosso su scala industriale, la possibilità di diminuire sensibilmente il tenore in acido malico dei mosti provocandone la fermentazione mediante l'impiego di stipiti di Sacch. cerevisiae opportunamente selezionati.

Fra i fattori che condizionano maggiormente la fermentazione maloalcolica si annoverano la concentrazione zuccherina del mosto, l'aerazione, la temperatura di fermentazione e, in laboratorio, l'aggiunta di tiamina.

La demolizione percentuale dell'acido malico non è invece risultata, nelle nostre condizioni operative (stipiti presi in considerazione e mosti utilizzati) apprezzabilmente influenzata dal pH né dal tenore iniziale di acido malico.

SUMMARY - Malic acid decomposition by Saccharomyces cerevisiae

In order to ascertain the possibility of lowering malic acid content in musts, specially selected strains of Saccharomyces cerevisiae were tested both in laboratory and in industrial scale fermentations.

Maloalcoholic fermentation resulted affected mainly by sugar and oxygen content of musts, as well as the temperature and, in laboratory, the thiamin addition. On the contrary, the pH and the initial malic acid amount did not show appreciable influence on malic acid breakdown in our experimental conditions (i.e. yeast strains used and chemical composition of musts).

RÉSUMÉ - Consommation de l'acide malique par Saccharomyces cerevisiae

On a conduit des essais soit au laboratoire

soit à la cave dans le but de réduire sensiblement la teneur en acide malique du moût par fermentation par des souches de Sacch. cerevisiae convenablement sélectionnées. Parmi les facteurs qui influencent davantage la fermentation maloalcoolique nous signalons la teneur en sucres du moût, l'aération, la température de fermentation et, en laboratoire, l'addition de thiamine. Le pourcentage d'acide malique dégradé, dans nos conditions de travail (souches et moûts testés), n'a pas été appréciablement influencé ni par le pH ni par la concentration initiale en acide malique.

BIBLIOGRAFIA CITATA

- BALLONI W. e FLORENZANO G. (1977): Lieviti selezionati in vinificazione: possibilità e limiti di impiego degli schizosaccaromiceti nella disacidificazione dei mosti e dei vini. Vini Italia, 19, 167-177.
- BARANOWSKI K. and RADLER F. (1984): The glucose-dependent transport of L-malate in Zygosaccharomyces bailii. Antonie van Leeuwenhoek, 50, 329-340.
- BERGMEYER H.U. (1974): Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim.
- CARRE E., LAFON-LAFOURCADE S. et BERTRAND A. (1983): Désacidification biologique des vins blancs secs par fermentation de l'acide malique par les levures. Connaissance Vigne Vin, 17, 43-53.
- CIOLFI G., CASTINO M. e DI STEFANO R. (1985): Studio sulla risposta metabolica di lieviti di specie diverse fermentanti un unico mosto a temperature comprese fra 10 e 40°C. Note I e II. Riv. Vitic. Enol., 38, 447-470 e 489-507.
- DELFINI C. e CERVETTI F. (1987): Esistenza nei mosti d'uva di un fattore che regola la produzione di acido acetico da parte dei lieviti. Vignevini, 14, 12, 55-60.
- DELFINI C. e CIOLFI G. (1979): Messa a punto di metodiche standardizzate per la determinazione dei caratteri enologici dei lieviti selezionati. I. Criteri generali metodologici. Riv. Vitic. Enol., 32, 431-439.
- DELFINI C. e CIOLFI G. (1980): Messa a punto di metodiche standardizzate per la determinazione dei

caratteri enologici dei lieviti selezionati. III. La determinazione dell'attitudine a degradare l'acido malico per fermentazione malolattica. Vini Italia, 22, 301-308.

FATICHE F., FARRIS G.A., DEIANA P. e CECCARELLI S. (1984): Malic acid production and consumption by selected strains of Saccharomyces cerevisiae under anaerobic and aerobic conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 427-429.

FUCK E. und RADLER F. (1972): Äpfelsäurestoffwechsel bei Saccharomyces. I. Der anaerobe Äpfelsäureabbau bei Saccharomyces cerevisiae. Arch. Mikrobiol., 87, 149-164.

FUCK E., STÄRK G. und RADLER F. (1973): Äpfelsäurestoffwechsel bei Saccharomyces. II. Anreicherung und Eigenschaften eines Malatenzym. Arch. Mikrobiol., 89, 223-231.

GAIA P. (1979): Attitudine alla fermentazione malolattica dei lieviti della blastoflora naturale dei mosti. Vini Italia, 21, 237-242.

GANDINI A. e TARDITI A. (1966): Vinificazione di mosti piemontesi con lieviti in associazione controllata e scalare. Industrie agrarie, 4, 411-420.

LAFON-LAFOURCADE S., BLOUIN J., SUDRAUD P. et PEYNAUD E. (1967): Essais d'utilisation de la thiamine au cours de vinifications expérimentales en vins blancs liquoreux. C.R. Acad. Agric. France, 53, 1046-1051.

MANACHINI P.L., MACONI E. e ARAGOZZINI F. (1988): Metabolismo microbico dell'acido malico in rapporto alla fermentazione malolattica. Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino, 12, in corso di stampa.

MARGHERI G., VERSINI G., PELLEGRINI R. e TONON D. (1986): L'azoto assimilabile e la tiamina in fermentazione. Loro importanza quali fattori di qualità dei vini. Vini Italia, 28, 3, 71-86.

OSOTHSILP C. and SUBDEN R. E. (1986): Malate transport in Schizosaccharomyces pombe. J. Bacteriol., 168, 1439-1443.

PEYNAUD E. (1938): L'acide malique dans les moûts et les vins de Bordeaux. Ann. Fals. Fraudes, 31, 332-347.

PEYNAUD E. et SUDRAUD P. (1964): Utilisation de l'effet désacidifiant des Schizosaccharomyces en

vinification de raisins acides. Ann. Techn. agric.,
13, 309-328.

RANKINE B.C. (1966): Decomposition of L-malic acid
by wine yeasts. J. Sci. Fd. Agric. 17, 312-316.

SCHNEIDER A., GERBI V. and REDOGLIA M. (1987): A
rapid method for separation and determination of
maior organic acids in grape musts and wines. Am.
J. Enol. Vitic., 38, 151-155.

TARANTOLA C. e GANDINI A. (1967): Esperienze di
disacidificazione biologica dei vini nel corso del
processo fermentativo. Vini Italia, 9, 451-460.

USSEGLIO-TOMASSET L. (1985): Chimica enologica.
AEB, Brescia.

VEZINHET F., BARRE P. (1982): Action de quelques
facteurs du milieu sur le métabolisme de l'acide
malique par Saccharomyces et Schizosaccharomyces au
cours de la fermentation alcoolique. Sci. Aliments,
2, 297-312.

VIDAL M. et BLOUIN J. (1978): Dosage colorimétrique
rapide de l'acide tartrique dans les moûts et les
vins. Rev. Fr. Oenol., 16, 39-46.

WAGNER K., KREUTZER P. und MAHLMEISTER K. (1986):
Der Äpfelsäureabbau in Abhängigkeit von
verschiedenen Reinzuchthefen. Weinwirtschaft
Technik, 122, 197-201.