

Indagini chimiche sui blastomiceti

Prof. Tommaso Castelli

(Ricevuto il 15 luglio 1941-XIX)

È notoria l'importanza che i caratteri biochimici hanno nello studio di identificazione dei microrganismi in genere e dei blastomiceti in particolare. Detti caratteri sono però considerati generalmente soltanto dal punto di vista qualitativo tralasciando pressochè completamente la parte quantitativa. Ciò è perfettamente logico allorchè si consideri l'argomento in senso naturalistico e forse anche da un punto di vista pratico in quanto che molto spesso il microbiologo è chiamato a dare una rapida diagnosi e pertanto egli deve seguire dei procedimenti di tecnica ben definiti e per quanto possibile semplici.

È anche nota l'aspirazione di ogni onesto ricercatore sull'unificazione dei procedimenti tecnici da adottare e sulla sistematica da seguire. Se per alcuni gruppi di schizomiceti, in particolare, ancora si è ben lungi da un vero accordo tra gli studiosi, per quanto riguarda i blastomiceti, per lo meno per gli sporigeni che comprendono le forme più interessanti dal punto di vista tecnico ed industriale, si può affermare con compiacimento che questo accordo è quasi completamente raggiunto. Oggi infatti i procedimenti di studio dei blastomiceti elaborati dalla Stelling-Dekker (1) e dalla Lodder (2) sono, possiamo dire, universalmente seguiti con evidente vantaggio sia dei ricercatori come del progresso scientifico. Ma i caratteri biochimici così determinati ben poco ci dicono allorchè noi consideriamo un lievito non dal punto di vista naturalistico ma da quello applicativo ed industriale. Noi sappiamo in proposito che nettissime differenze esistono tra specie e specie, tra le singole varietà e forse nei singoli individui. Basta allo scopo pensare all'industria della birra ove i più diversi tipi di questa bevanda vengono ottenuti anche dall'impiego di alcune particolari razze di lievito appartenenti tutte però ad una medesima specie; il Sacch. cerevisiae Hansen. Tutti sanno anche quanto numerosi siano i lavori di ogni genere comparsi sul Sacch. cerevisiae e quali evidenti benefici ha tratto da essi l'industria della birra. Per quanto riguarda l'industria enologica sia per ciò che interessa la conoscenza delle forme che più facilmente e con particolare frequenza si isolano dai mosti in fermentazione, e che pertanto si debbono ritenere gli agenti responsabili del processo, come per quanto riguarda l'intima conoscenza del chimismo di dette forme, è d'uopo riconoscere che poco si è fatto in proposito e quel poco non è affatto coordinato. Nei principali paesi vinicoli sono stati eseguiti lavori spesso interessanti ma non ricerche sistematiche e ben coordinate e pertanto l'utilità che l'industria enologica ha potuto trarre da questi studi è stata ben relativa. Ciò che affermo non è soltanto una mia convinzione, mi piace anzi riportare quanto scrisse il compianto prof. G. Paris a pagina 191 del suo trattato, fin dal 1931: « Se gli studi di chimica applicata all'enologia sono da noi molto sviluppati, non si può dire

altrettanto di tutto quanto riguarda la conoscenza dei germi che fanno fermentare i nostri mosti. Rivolgendo l'attenzione a questo ramo della scienza agraria, la tecnica enologica se ne potrebbe molto giovare ». Ben differente è, come tutti sanno, la birra dal vino e mentre per la birra è facile ottenere dei tipi ben caratterizzati e costanti poichè sia il materiale che fermenta, come il lievito che si adopera in qualità e in quantità, come i procedimenti tecnici sono ben definiti, per il secondo le caratteristiche variano di anno in anno principalmente con la materia prima che deve fermentare e cioè del mosto d'uva. Altra considerazione fondamentale è che mentre la produzione della birra è una vera industria e pertanto in essa cooperano chimici e tecnici, la produzione del vino, nella sua grande maggioranza, è un'industria svolta dall'agricoltore. È molto probabile però che dallo studio sia naturalistico come chimico delle forme di lievito che con particolare frequenza si isolano dai mosti in fermentazione nelle singole regioni italiane, grande giovamento ne potrà trarre l'industria enologica.

Con questo intendimento sono state iniziate fin dal 1933, nel Laboratorio di microbiologia agraria e tecnica, ricerche sistematiche sugli agenti della fermentazione vinaria nelle diverse regioni italiane. Nel 1935 è apparsa infatti la relazione di De' Rossi (3) sui lieviti della regione umbra, a detto lavoro sono seguite le mie ricerche (4), (5) sugli agenti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe e quelle, di prossima pubblicazione, di Santarelli (6) sugli agenti della fermentazione vinaria nella zona dei colli romani. Presentemente in laboratorio si stanno eseguendo indagini su mosti prelevati nell'Orvietano e nel Viterbese.

Nella presente nota si riferiscono delle indagini chimiche condotte su una serie di blastomiceti della collezione del laboratorio e isolati dai materiali più vari. Dette ricerche si possono considerare come di introduzione ad altre che seguiranno e che saranno condotte esclusivamente su blastomiceti isolati da mosti d'uva in fermentazione e dove l'indagine sarà rivolta essenzialmente alle eventuali differenze di alcuni costituenti chimici di liquidi fermentati da blastomiceti posti in varie condizioni d'ambiente (temperatura - mosti di diversa origine e di diversa costituzione chimica). La finalità di queste ricerche è quella di indagare se tra i numerosi stipiti che si saggeranno riuscirà possibile individuare farnie che presenteranno particolari caratteristiche quali ad esempio la capacità a fermentare bene a temperature relativamente basse o elevate, ad agire bene in mosti con vario contenuto in zucchero e con varia acidità. È, in poche parole, il da tempo invocato lavoro sulla selezione dei lieviti che ha per scopo finale la possibilità di poter fornire agli agricoltori degli stipiti di saccaromiceti adatti per una regolare fermentazione dei mosti nelle diverse condizioni ambientali delle singole zone italiane. Lavoro lungo, non facile, è dunque quello al quale ci siamo accinti, ma l'importanza pratica dell'argomento è talmente evidente che ci servirà di sprone per sorpassare le varie difficoltà che incontreremo nella lunga ricerca. Non è scopo di questi lavori l'indagine dell'utile impiego di particolari lieviti per la vinificazione di

vini fini e speciali, nè tanto meno il riaccendere la polemica sorta a proposito delle mie ricerche sugli agenti della vinificazione nel Chianti classico tra i proff. Paulsen, Carpentieri e il sottoscritto (7). Sta di fatto però che mentre per l'ottenimento di vini particolarmente pregiati non sappiamo se sia bene lasciare fermentare il mosto naturalmente o impiegare lieviti puri, ben diversamente vanno le cose per la vinificazione dei vini comuni da pasto. Per l'ottenimento di questi ultimi vini e principalmente per garantire una regolare fermentazione alcolica tutti sono d'accordo ormai sull'utilità dell'impiego dei lieviti puri e particolarmente di mettere in opera detta pratica nelle annate di cattivo andamento stagionale e di invasioni crittogamiche. Del tutto recentemente è apparsa una breve nota riassuntiva sullo stesso argomento da parte di Mensio, C. Tarantola e G. Tarantola (8) di un lavoro presentato al V Congresso della vite e del vino a Lisbona nel 1838 e non ancora comparso in Italia. In attesa di conoscere per esteso l'interessante lavoro di Mensio e collaboratori non credo sia possibile condividere pienamente ciò che si è affermato.

In questa nota che può ritenersi come introduttiva e alla quale seguirà tra breve il risultato dell'azione della temperatura sul chimismo dei lieviti isolati da mosti d'uva, sono riferite alcune analisi chimiche condotte su liquidi fermentati ottenuti inoculando uno stesso mosto con 27 diversi stipiti di blastomiceti.

La tecnica seguita è stata la seguente. Tutti gli stipiti sono stati seminati sul medesimo mosto d'uva bianca zuccherato, filtrato e sterilizzato. Il mosto, che conteneva il 26 % di zucchero e 13 grammi per litro di acidità totale espressa come acido tartarico, venne posto in ragione di 200 cc in matracci della capacità di 250 cc. Ogni matraccio venne seminato con un'ansata di patina microbica di 3 giorni a 30° sviluppata su agar di malto e fu tenuto per un mese in ambiente a temperatura media di 18°.

Le analisi chimiche eseguite furono le seguenti:

- a) determinazione del grado alcolico per distillazione;
- b) determinazione dell'acidità totale;
- c) determinazione dell'acidità volatile;
- d) ricerca dell'acetoina.

I procedimenti analitici usati per le tre prime determinazioni sono quelli stabiliti dalla Commissione tecnica per gli studi relativi alla viticoltura e alla enologia (9), per l'acetoina è stato seguito il metodo indicato da L. C. E. Kniphorst e C. J. Krnisher (10).

Nella sottostante tabella sono riassunti i risultati ottenuti; in essa in una prima colonna è riportato il numero dello stipite secondo le indicazioni della collezione del laboratorio, nella seconda viene riportata la specie e nella terza l'ambiente da dove lo stipite venne isolato e l'anno d'isolamento; nelle altre colonne sono riuniti i valori dell'alcol espresso come % in volume, dell'acidità totale come grammi di acido tartarico per litro, dell'acidità volatile come grammi di acido acetico per litro; infine per l'acetoina il segno — ne indica l'assenza mentre i segni + ne indicano la presenza più o meno abbondante.

Stipite	Specie	Ambiente ed anno d'isolamento	Alcol	Ac. totale	Ac. volatile	Acetoina
20	Sacc. ellipsoideus	Mosto d'uva 1933	15,42	10,42	0,75	—
1	Sacc. ellipsoideus	Mosto d'uva 1909	12,00	10,70	1,15	—
364	Sacch. ellipsoideus var. major	Mosto d'uva 1936	10,70	10,60	1,04	—
40	Sacc. ellipsoideus var. umbra	Mosto d'uva 1933	11,56	10,56	0,97	—
407	Sacch. carls. var. valdensis	Laghbi tripolino 1939	11,40	11,30	0,63	—
408	Sacch. carls. var. monacensis	Laghbi tripolino 1939	11,70	10,60	0,54	—
386	Sacch. Pastorianus	Mosto d'uva 1936	9,60	10,85	0,51	—
366	Sacch. uvarum	Mosto d'uva 1936	11,60	10,55	0,67	+
404	Sacch. laghbi	Laghbi tripolino 1939	7,70	11,10	1,90	++
373	Sacch. exiguus	Mosto d'uva 1936	9,30	11,10	1,88	—
363	Sacch. italicus	Mosto d'uva 1936	10,16	10,60	1,21	—
L. 59	Sacch. Rouxi	Acqua di vegetazione olive 1938	8,86	10,22	0,91	—
403	Sacch. oviformis var. bisp.	Mosto d'uva 1938	4,32	10,00	0,36	—
56	Sacch. des Ludwigii	Mosto d'uva 1936	9,05	10,85	1,18	++++
406	Schizosacch. Pombe	Laghbi tripolino 1939	10,06	10,15	1,07	+++
54	Hansenula sp.	Lievito di pane 1933	3,64	10,00	0,38	—
52	Hansenula nivea	Lievito di pane 1933	3,90	10,00	0,60	—
51	Hansenula panis	Lievito di pane 1933	4,00	10,30	0,23	—
166	Debaryomyces sp.	Prosciutto 1935	0,50	9,70	0,13	—
70	Pseudosacch. apiculatus	Mosto d'uva 1933	5,72	9,85	1,03	+
103	Pseudosacch. magnus	Mosto d'uva 1933	9,30	9,80	0,80	++++
118	Torulopsis lactis	Chefir 1931	3,36	10,15	0,38	—
113	Torulopsis pulcherrima	Mosto d'uva 1933	3,90	9,85	0,23	—
L. 5	Torulopsis Holmii	Acqua di vegetazione olive 1938	3,64	9,85	0,40	—
134	Mycotorula albicans	Lievito di pane 1933	4,60	10,15	0,34	—
L. 13	Trichosporon sp.	Acqua di vegetazione olive 1938	2,14	10,80	0,56	—
149	Sporotrichum Carougeaui	Lievito di pane 1933	3,36	9,85	0,18	—

I risultati analitici esposti nella tabella confermano una serie di fatti. Così viene ribadita la più volte segnalata notevole produzione di alcol da parte delle specie del genere *Saccharomyces*; tra queste il valore massimo è stato riscontrato per uno stipe di *Saccharomyces ellipsoideus* mentre il valore minimo è stato fornito dalla varietà *bisporus* del *Saccharomyces oviformis*. Tra le altre saccaromicetacee quantità elevate di alcol vengono formate dallo *Schizosaccharomyces Pombe* e dal *Saccharomyces Ludwigii*, mentre quantità molto basse da specie del genere *Hansenula* e da una specie del genere *Debaryomyces*. I lieviti apiculati piccoli da riportarsi alla specie *Pseudosaccharomyces apiculatus* Klocker producono quantità basse di alcol mentre quantità discrete vengono fornite dal *Pseudosaccharomyces magnus*. Infine per quanto riguarda le specie da riportarsi ai generi *Torulopsis*, *Mycotorula*, *Sporotrichum* e *Trichosporon*, l'alcol formato appare in quantità assai modesta.

La produzione di acidità volatile appare assai varia nei diversi stipiti; essa è assai bassa nelle specie dei generi *Torulopsis*, *Mycotorula*, *Trichosporon* e *Sporotrichum*. Nei lieviti apiculati l'acidità volatile è relativamente bassa nel *Pseudosacch. magnus* e molto più elevata nel *Pseudosacch. apiculatus*. Tra le saccaromicetacee è bassa nelle specie appartenenti ai generi *Hansenula* e *Debaryomyces* ed elevata nel *Saccharomyces Ludwigii* e nello *Schizosaccharomyces Pombe*. Nel genere *Saccharomyces* si notano specie come il *Sacch. oviformis* e il *Sacch. Pastorianus* che producono quantità molto basse di acidità volatile mentre elevate quantità vengono prodotte dal *Sacch. laghbi* e dal *Sacch. exiguus*. Tra le forme da riportare al *Sacch. ellipsoideus*, o a varietà di esso, le quantità di acidità volatile fornite appaiono fortemente diverse; relativamente bassa nello stipe 20, che è un tipico *Sacch. ellipsoideus*, e discretamente più elevata sia nella varietà *umbra* come nella varietà *major*.

Si è notato che i valori dell'acidità volatile sono apparsi in genere elevati, occorre in proposito però tener presente che il mosto era molto zuccherino e che altri autori, tra i quali ricordo Salvarezza (11), hanno visto che l'acidità volatile è tanto più grande per quanto più elevato è il tenore zuccherino del mosto. L'acetoina è stata riscontrata presente in 6 su 27 campioni esaminati.

Che possa sussistere una correlazione tra produzione di acidità volatile e acetoina, come è stato dimostrato in alcune esperienze precedenti (12), appare probabile, pur non verificandosi in modo costante. Così infatti l'acetoina si è riscontrata nel campione di mosto fermentato dal *Sacch. laghbi* ove si è trovata la massima produzione di acidità volatile e nei campioni fermentati dal *Saccharomyces Ludwigii*, *Schizosaccharomyces Pombe* e *Pseudosaccharomyces apiculatus* ove le quantità di acidità volatile erano notevoli. L'acetoina è stata poi riscontrata scarsamente nel campione fermentato dal *Sacch. uvarum* ove la produzione di acidità volatile è stata molto scarsa e infine nel campione fermentato dal *Pseudosacch. magnus* accanto a quantità molto modeste di acidità volatile corrispondono forti quantità di acetoina. Occorre poi anche notare che nel campione fermentato dal *Sacch. exiguus* di fronte a quantità molto forti di acidità volatile formate, l'acetoina non è stata riscontrata nemmeno in traccia.

Un fatto appare ben stabilito e cioè che nei liquidi fermentati ove la quantità di acidità volatile è molto scarsa, l'acetoina non si riscontra. Pertanto non si

può stabilire, in senso assoluto, che esista una costante correlazione tra produzione di acidità volatile ed acetoina, pur notandosi in maniera evidente che quest'ultima si ricontra, generalmente, nei liquidi che presentano forti quantità di acidità volatile.

È molto probabile che la produzione di acetoina possa venire influenzata, come d'altronde tutto il chimismo dei lieviti, anche dalla natura del mezzo in cui i blastomiceti sono posti e forse principalmente delle temperature alle quali i lieviti si pongono ad agire. Ricerche già eseguite in proposito e che verranno pubblicate tra brevissimo tempo, sembrano avvalorare questo punto di vista.

RIASSUNTO

Sono state eseguite ricerche chimiche su liquidi completamente fermentati ottenuti seminando uno stesso mosto d'uva con 27 stipiti di blastomiceti isolati dagli ambienti più vari. Viene messo in rilievo il fatto che generalmente si è constatata una certa correlazione tra produzione di acidità volatile ed acetoina.

ZUSAMMENFASSUNG

An vollständig vergährten Flüssigkeiten die durch Beimpfung eines Traubenmostes mit 27 Blastomyceten-Stämmen erhalten wurden, sind chemische Untersuchungen angestellt worden. Im allgemeinen war ein gewisses Verhältnis zwischen flüchtiger Azidität- und Acetoin-Bildung zu beobachten.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *Stelling-Dekker*. - Die Sporogenen Hefen. «Uitgave De Koninklijke Akad Van Wetenschappen Te Amsterdam», 1931.
- (2) *Lodder*. - Die Anaskosporogenen Hefen. «N. V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij», Amsterdam, 1934.
- (3) *De' Rossi*. - I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra. «Rel. al IV Congr. Int. della vigna e del vino». Lausanne, 1935.
- (4) *Castelli*. - I lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico e zone limitrofe. «Nuovi Annali dell'Agricoltura», XIX, 1939.
- (5) *Castelli*. - Ancora sui lieviti della fermentazione vinaria nel Chianti classico - «Nuovi Annali dell'Agricoltura», XIX, 1939.
- (6) *Santarelli*. - I lieviti della fermentazione vinaria nella zona dei colli romani. Di prossima pubblicazione.
- (7) *Paulsen-Carpentieri-Castelli*. - In tema di fermenti alcoolici. «Il Colt. e Gior. Vinicolo Ital.», N.° 6, 7, 9, 13, anno 86-1940.
- (8) *Mensio-C. Tarantola-G. Tarantola*. - Osservazioni sull'impiego dei fermenti selezionati e dell'anidride solforosa nella vinificazione. «Il Colt. e Gior. Vinicolo Ital.» N.° 8, 9, anno 87-1940.
- (9) *Mini. Agric. e Foreste*. - Ricerche da eseguirsi sulle uve, sui mosti e sui vini a scopo ampelografico. «Roma, Tip. Fed. Ital. Cons. Agr., 1933».
- (10) *Antoniani-Candia Castelli*. - Contributi alla conoscenza del chimismo fermentativo dei lieviti apiculati. «Annali di Microbiologia», vol. 1-3-1941.
- (11) *Salvarezza*. - L'acidità volatile dei vini nel corso della fermentazione. «L'Italia Agricola», N.° 2, 1937.
- (12) Vedi N.° 10.