

Contributo alla conoscenza dei lieviti di alcuni formaggi

Prof. Tommaso Castelli

Il ruolo che i blastomiceti esercitano nel processo di maturazione dei formaggi è ancora malsicuro e variamente interpretato.

Logicamente l'attività che detti microrganismi possono esercitare è diversa e variabile con i procedimenti tecnici che si mettono in opera per l'ottenimento dei singoli tipi di formaggio. Si ritiene, generalmente, che nei formaggi a pasta dura e cotta e a lungo periodo di stagionatura l'attività dei lieviti sia del tutto insignificante. Molti autori invece, pur riconoscendo che l'attività dei lieviti si espliciti maggiormente nei formaggi molli, ritengono che non si possa escludere un utile intervento di detti microbi anche nell'ottenimento dei formaggi a pasta cotta ed a lungo periodo di stagionatura. E' stato, particolarmente, il Korolev (1) sostenitore della attività utile dei lieviti nei prodotti di trasformazione del latte (burro e formaggi).

Che i lieviti si riscontrino nel latte e che pertanto passino nel burro e nel formaggio è un fatto noto, ma quale sia in realtà l'attività che detti microrganismi esplicano nell'ottenimento delle caratteristiche del burro e dei vari tipi di formaggio è, secondo il mio modesto parere, un argomento sul quale gli uomini di laboratorio debbono ancora utilmente indagare. Conosciamo benissimo quale sia il ruolo dei lieviti per l'ottenimento delle varie bevande fermentate del latte e sappiamo anche che fermenti lattici e fermenti alcolici possono sviluppare benissimo in simbiosi. La mia, ormai lunga, pratica di laboratorio mi permette di affermare che sia lo sviluppo come la vitalità dei fermenti lattici (lattobacilli e streptococchi) e dei fermenti alcolici vengono ad essere esaltati allorchè, in adatti terreni di cultura ed a convenienti temperature, i microrganismi vengono coltivati mescolati anzichè isolati. Quali siano poi le intime ragioni che favoriscono sia lo sviluppo come la sopravvivenza, non è certamente una questione molto semplice a spiegarsi anche perchè non completamente chiarita ed in ogni modo essa esula dallo scopo del presente lavoro.

Potendo avere a disposizione in maniera costante vari tipi di formaggio prodotti nell'alta valle del Tevere ed ottenuti sia da solo latte di pecora, come da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due, ho creduto opportuno sottoporli ad un'indagine sia a riguardo delle specie di blastomiceti che in essi si riscontravano come del loro quantitativo.

Prima di riferire le indagini eseguite credo necessario riassumere le conoscenze rese note negli ultimi anni e riguardanti particolarmente le indagini eseguite su prodotti italiani. Nel 1932-33 sono apparsi due pregevoli lavori di Sacchetti (2) (3). Questo autore ha preso in considerazione dei formaggi molli sia preparati nel bolognese come uno stracchino lombardo. Nei due lavori vengono descritti diversi blastomiceti sia sporigeni come del tutto incapaci a produrre spore isolati da tali formaggi; oltre allo studio di identificazione vengono forniti i risultati ottenuti da alcuni saggi e vengono riferiti i referti ottenuti dall'immissione di diverse forme di blastomiceti in un formaggio stracchino. Nelle note di Sacchetti, pur non essendo state eseguite conte, si afferma che il contenuto in lieviti dei formaggi considerati era elevatissimo ed in ogni modo superiore a quello dei batteri e degli eumiceti.

Luchetti e Nanni (4) descrivono due nuove specie di lieviti isolati dal formaggio « Bel Paese », e Luchetti (5) in un contributo allo studio della flora blastomicetica di formaggi pecorini, riferisce le indagini eseguite su sette campioni di formaggio di latte di pecora di diversa provenienza. Luchetti, dopo aver rapidamente accennato alla tecnica seguita, descrive diversi ceppi da riportarsi a *Monilia*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Torulopsis*. Traetta, Mosca e Navone (6) descrivono tre forme di saccaromiceti isolati dal formaggio pecorino romano. Dalla Torre (7) ha messo in evidenza nel formaggio « Bel Paese » quantità notevoli di blastomiceti. I lieviti raggiungevano cifre di oltre 120 milioni per grammo di crosta a semimaturità mentre nella parte interna ed a completa maturità il numero scendeva a tre milioni per grammo di materiale. Anche dalle indagini di vecchi ricercatori Esten e Mason (8), Eduard (9), Beijerinck (10) risulta che molto spesso sono stati, dai formaggi, messi in evidenza lieviti ma che, sia sul loro numero come sulla reale attività, i criteri erano molto discordi.

I risultati ottenuti dalle mie indagini si distaccano notevolmente da quelli ottenuti da altri ricercatori e ciò spiega il perchè della presente nota. Darò, per sommi capi, la tecnica seguita nelle ricerche. Come ho già detto l'indagine, che si può considerare come orientativa, è stata rivolta sia a prodotti ottenuti da solo latte di pecora o da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due latti, ed eseguita in vari momenti della maturazione dei formaggi. Furono eseguiti isolamenti facendo culture per disseminazione su gelatina al mosto d'uva come conte culturali valendosi del medesimo substrato. In ogni caso il materiale posto in analisi è stato prelevato nella parte interna della forma. Il prelevamento del campione da sottoporre all'analisi è stato ottenuto nella seguente maniera. Mediante una trivella da formaggio sterilizzata venivano presi dalla parte interna del formaggio diversi campioni di pasta che venivano accuratamente mescolati in un mortaio sterilizzato. Si pesavano poi, sempre operando in asepsi, due grammi della poltiglia che venivano successivamente disgregati, in un mortaio sterilizzato, con acqua sterile fino ad ottenere una sospensione finissima. Sempre con acqua sterile si riprendeva il tutto, si lavava il mortaio e si riportava a volume di 100 cc. m una bottiglietta a tappo smerigliato della capacità di 200 cc.

Da questa sospensione, opportunamente agitata, veniva prelevato il materiale sia per le culture di isolamento come per l'allestimento delle conte.

Per le conte sono state messe in opera le seguenti modalità: in tre piastre Petri di 9 cm. di diametro si portavano rispettivamente 1/2- 1/10- 1/20 di cc. della sospensione e successivamente si versava nelle piastre, agitando opportunamente, la gelatina di mosto. Dal numero di colonie blastomicetiche sviluppate, in un periodo di osservazione di 15 giorni alla temperatura di 18°, si risaliva al contenuto di blastomiceti per grammo di formaggio.

Nella sottostante tabellina sono riassunti i risultati ottenuti; in una prima colonna di essa è riportato il numero di riferimento del campione esaminato, in una seconda i dati relativi alla qualità del formaggio e al periodo di stagionatura, mentre nella terza colonna sono indicate le cifre di blastomiceti riscontrati per grammo di materiale. Debbo fin da ora accennare che lo sviluppo ottenuto nelle piastre mostrava una grande uniformità nei tipi di colonie sviluppate.

Numero di riferimento	Caratteri dei campioni di formaggio					Risultati delle conte
1	formaggio	di solo	latte di	pecora	5 mesi e mezzo	2.000.000
11	id.	id.	id.	id.	4 mesi	1.435.000
10	id.	id.	id.	id.	di circa un mese	425.000
7	id.	id.	id.	id.	12 mesi	5.500
2	formaggio	di solo	latte di	vacca	di circa un mese	2.500.000
5	id.	id.	id.	id.	5 mesi	1.500.000
8	id.	id.	id.	id.	6 mesi	300.000
9	id.	id.	id.	id.	7 mesi	350.000
6	formaggio	di latte	di pecora	e vacca	di circa 25 giorni	3.000.000
3	id.	id.	id.	id.		500.000
4	formaggio	Grana	di oltre	un anno	5 mesi	18.000

La tabellina dimostra che il contenuto in lieviti nei formaggi esaminati non è molto elevato e che il loro numero va decisamente diminuendo con la stagionatura. Ciò si verifica sia per i formaggi ottenuti da solo latte di pecora come da solo latte di vacca o dalla mescolanza dei due. Avendosi a disposizione un formaggio Grana, vecchio di oltre un anno, si è voluto anche su di esso eseguire la medesima indagine e le cifre riscontrate per il Grana sono risultate simili a quelle trovate per gli altri formaggi.

Nelle culture di isolamento per disseminazione su gelatina al mosto d'uva, dopo 8-10 giorni alla temperatura di 18°, si osservava sufficiente sviluppo da permettere un facile isolamento. Come per le indagini eseguite sugli agenti della vinificazione nelle diverse regioni italiane (11) (12) si è avuto di mira di eseguire isolamenti soltanto da quelle colonie che erano in nettissima predominanza, perchè soltanto le forme rappresentate in largo numero sono quelle che possono, eventualmente, esplicare una funzione. E' facile farsi un concetto della predominanza delle colonie sia eseguendo un attento esame macroscopico, eventualmente valendosi anche di osservazioni a piccolo ingrandimento, come facendo una serie di preparati per impressione che, colorati e posti al microscopio, mostrano le forme che co-

stituiscono le singole colonie. Come ho già detto l'aspetto delle singole piastre era generalmente molto uniforme e pertanto a volte è stato eseguito un solo isolamento, ma per lo più due ed a volte tre ed anche quattro.

Sono state, in tal maniera, isolate 25 culture di lievito che sono state sottoposte allo studio di identificazione. La tecnica seguita allo scopo, è quella da tempo messa in uso in laboratorio e che corrisponde, con qualche lieve modifica, a quella seguita ed indicata dagli studiosi olandesi Stelling-Dekker (13), Lodder (14), Lodder e Diddens (15). Ne darò pertanto un rapido cenno.

La forma e le dimensioni delle cellule sono state stabilite in culture in mosto d'uva ed agar di malto rispettivamente di 24 ore e tre giorni a 25°. La fusione della gelatina è stata ricercata su infissioni in gelatina di mosto e su colonie giganti allestite sul medesimo substrato, mantenute in osservazione per circa due mesi alla temperatura di 18°.

La ricerca della capacità a sporificare è stata eseguita su agar di malto, agar Gorodkova ed eventualmente sul gesso e sulla silice. La fermentescibilità degli zuccheri è stata ricercata su brodo di carne con l'aggiunta del 2% dello zucchero, posto in provette Durham. Il potere fermentativo è stato misurato ricercando la quantità di alcol prodotto, per distillazione, seminando i singoli ceppi in mosto sterile al 30% di zucchero ed eseguendo l'analisi dopo trenta giorni di permanenza in ambiente a 18°. Per l'assimilazione dell'alcol etilico, quale unico alimento idrocarbonato, come per il saggio di assimilazione dei nitrati, mi sono attenuto alle modalità indicate dalla Stelling Dekker.

Ritengo più dimostrativo esprimere i risultati dei diversi saggi eseguiti riunendoli nella seguente tabella riassuntiva ove in tante colonne sono riunite le osservazioni eseguite, mentre un'apposita leggenda servirà a chiarire le diverse indicazioni.

Campione di formaggio	Stipite	1	2	3	4	5	6	Saggio della sporificazione	Fermentazione					Potere fermentativo	Diagnosi
		Colonia su ge- latina su mosto	Aspetto cultura su mosto	Esame microsc. su mosto	Aspetto cultura su agar malto	Esame microsc. su agar malto	Infissione su ge- latina di mosto		Glucosio	Galattosio	Saccarosio	Maltosio	Lattosio		
I	1	A	A	A	B	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces Klöckeri
	2	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	3	E	B	B	C	B	B	partenogenesi 1-2-3-4 spore	+	+	+	+	—	13,22	Saccharomyces ellipsoideus
	4	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
II	5	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	—	+	4,95	Zygosaccharomyces lactis
	6	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	7	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
III	8	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	9	B	C	C	D	D	C	—	—	—	—	—	—	—	Rhodotorula longissima
IV	10	A	A	A	A	A	A	contigugazione una spora	—	—	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

II	A	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
V	12	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	13	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VI	14	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	+	Zygosaccharomyces lactis
VII	15	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VIII	16	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	17	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	18	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
IX	19	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	20	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
X	21	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	22	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	23	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
XI	24	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	—	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	25	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

LEGGENDA

1 = Aspetto delle colonie su gelatina di mosto dopo 8 giorni a 18°.

- A = colonia gibbosa, di colore bianco latteo, opaca, distaccantesi integralmente dal substrato.
- B = colonia cremosa di colore rosa corallo.
- C = colonia di colore grigiastro a margini dentati.
- D = colonia di colore bianco, mucosa.
- E = colonia sopraelevata, a cornetto, di colore bianco giallognolo.

2 = Aspetto della cultura su mosto dopo 15 giorni a 25°

- A = mosto torbido, deposito, velo liscio risaliente di colore bianco.
- B = fermentazione attiva, deposito.
- C = intorbidamento, deposito e traccia di velo rossiccio.

3 = Aspetto microscopico della cultura in mosto d'uva dopo 24 ore a 25°.

- A = cellule di forma globosa con globulo centrale, isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, dimensioni μ 3-4 x 3-5.
- B = cellule ovalari o ellittiche, isolate o a piccoli gruppi, delle dimensioni di μ 5-7 x 8-12.
- C = cellule per lo più a forma di salsiccia, dimensioni μ 4-5 x 8-15.

4 = Aspetto delle culture su agar di malto dopo 30 giorni a 25°.

- A = patina biancastra di aspetto asciutto.
- B = patina mucosa di colore tendente al giallastro.
- C = patina liscia di colore bianco.
- D = patina di colore rosa aranciato, splendente, mucosa, liscia a margini interi.

5 = Esame microscopico su agar di malto dopo 3 giorni a 25°

- A = cellule globose isolate o a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 3,5-5.
- B = cellule ovalari isolate o a gruppetti di μ 6-8 x 10-12.
- C = cellule globose o leggermente ovalari, isolate o riunite a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 2,5-3 x 5-6.
- D = cellule a forma di salsiccia di μ 8 x 12-14.

6 = Aspetto dell'infissione su gelatina di mosto dopo 30 giorni a 18°

- A = sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, espansa, patina di colore bianco latteo, assenza di liquefazione.
- B = sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, mucosa, e forte fessuramento della gelatina per produzione di gas, assenza di liquefazione.
- C = sviluppo quasi esclusivamente in superficie di patina di colore rosa.

Le indicazioni + e - relative ai saggi di fermentazione, stanno ad indicare: fermenta e non fermenta.

II	A	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
V	12	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	13	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VI	14	C	B	B	A	B	B	isogamia 1-4 spore	+	+	+	+	Zygosaccharomyces lactis
VII	15	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	16	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
VIII	17	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	18	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
IX	19	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	20	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
X	21	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	22	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
	23	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola
XI	24	D	B	A	A	A	B	isogamia 2-4 spore	+	+	+	—	Zygosaccharomyces Barkeri
	25	A	A	A	A	A	A	coniugazione una spora	—	—	—	—	Debaryomyces tirocola

LEGGENDA

- 1 = Aspetto delle colonie su gelatina di mosto dopo 8 giorni a 18°.
- A= colonia gibbosa, di colore bianco latteo, opaca, distaccantesi integralmente dal substrato.
 - B= colonia cremosa di colore rosa corallo.
 - C= colonia di colore grigiastro a margini dentati.
 - D= colonia di colore bianco, mucosa.
 - E= colonia sopraelevata, a cornetto, di colore bianco giallognolo.
- 2 = Aspetto della cultura su mosto dopo 15 giorni a 25°.
- A= mosto torbido, deposito, velo liscio risalente di colore bianco.
 - B= fermentazione attiva, deposito.
 - C= intorbidamento, deposito e traccia di velo rossiccio.
- 3 = Aspetto microscopico della cultura in mosto d'uva dopo 24 ore a 25°.
- A= cellule di forma globosa con globulo centrale, isolate o riunite a gruppi di pochi elementi, dimensioni μ 3-4 x 3-5.
 - B= cellule ovalari o ellittiche, isolate o a piccoli gruppi, delle dimensioni di μ 5-7 x 8-12.
 - C= cellule per lo più a forma di salsiccia, dimensioni μ 4-5 x 8-15.
- 4 = Aspetto delle culture su agar di malto dopo 30 giorni a 25°
- A= patina biancastra di aspetto asciutto.
 - B= patina mucosa di colore tendente al giallastro.
 - C= patina liscia di colore bianco.
 - D= patina di colore rosa aranciato, splendente, mucosa, liscia a margini interi.
- 5 = Esame microscopico su agar di malto dopo 3 giorni a 25°
- A= cellule globose isolate o a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 3,5-5.
 - B= cellule ovalari isolate o a gruppetti di μ 6-8 x 10-12.
 - C= cellule globose o leggermente ovalari, isolate o riunite a piccoli gruppi delle dimensioni di μ 2,5-3 x 5-6.
 - D= cellule a forma di salsiccia di μ 8 x 12-14.
- 6 = Aspetto dell'infissione su gelatina di mosto dopo 30 giorni a 18°
- A= sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, espansa, patina di colore bianco latteo, assenza di liquefazione.
 - B= sviluppo a chiodo con testa sopraelevata, mucosa, e forte fessuramento della gelatina per produzione di gas, assenza di liquefazione.
 - C= sviluppo quasi esclusivamente in superficie di patina di colore rosa.

Le indicazioni + e - relative ai saggi di fermentazione, stanno ad indicare: fermenta e non fermenta.

Nella seguente sottostante tabella sono riportate le specie isolate con le indicazioni relative ad i campioni di formaggio su cui vennero riscontrate e del numero complessivo di stipiti isolati per le diverse specie.

Specie	Formaggi in cui la specie venne riscontrata	Numero degli stipiti isolati
<i>Debaryomyces tirocola</i>	1-2-3-4-5-7-8-9-10-11	17
<i>Zygosaccharomyces lactis</i>	2-6	2
<i>Zygosaccharomyces Barkeri</i>	9-11	3
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	1	1
<i>Debaryomyces Klöckeri</i>	1	1
<i>Rhodotorula longissima</i>	3	1

L'esame della tabella dimostra in maniera evidente che il genere di blastomiceti predominante è il genere *Debaryomyces* e la specie che, quasi costantemente si riscontra, è quella descritta da Konokotine come *Debaryomyces tirocola*. Appartenente al genere *Debaryomyces*, ma riscontrata in un solo campione di formaggio, è la specie *Deb. Klöckeri*. In quattro campioni di formaggi o sono state isolate delle forme da riportarsi al genere *Zygosaccharomyces*, l'identificazione delle quali ha dimostrato trattarsi dello *Zygosaccharomyces Barkeri* e *Zygosaccharomyces lactis*. Del tutto casuale si deve intendere l'isolamento del *Saccharomyces ellipsoideus* e della *Rhodotorula longissima* in un solo campione di formaggi.

Lo studio di identificazione ha mostrato qualche difficoltà a riguardo del *Deb. tirocola* poiché i numerosi stipiti isolati presentavano delle differenze, sia pur lievi ma costanti, a riguardo degli aggruppamenti cellulari come, maggiormente, delle dimensioni delle cellule. Le mie osservazioni confermano quindi quelle di Konokotine (16) che, del *Debaryomyces tirocola*, ne distinte quattro varietà e precisamente α , β , γ , δ . Nella monografia della Stelling Dekker le varietà del *Debaryomyces tirocola* distinte dal Konokotine sono indicate come stipite 1, 2, 3. Le culture da me isolate sono da riportare, principalmente allo stipite 2, cui seguono quelle da ritenersi identiche allo stipite I ed ultime, numericamente, quelle riferibili allo stipite 3. Il lavoro da me eseguito conferma quindi le indagini di Konokotine il quale isolò il *Deb. tirocola* appunto dal formaggio.

Mi sembra quindi lecito affermare che nei formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere i lieviti che si riscontrano si debbono, più che altro, riportare al genere *Debaryomyces* e particolarmente alla specie *tirocola*.

Anche nelle ricerche eseguite sull'unico campione di formaggio Grana, è stato trovato il *Deb. tirocola*, anzi nell'analisi del detto formaggio l'uniformità delle colonie sviluppate sulle piastre era tale che si ritenne opportuno eseguire un solo isolamento.

Per quale ragione nei formaggi da me esaminati sono stati riscontrati i *Debaryomyces* che nessuno degli autori italiani ha messo in evidenza

nei formaggi prodotti in Italia? I risultati da me messi in evidenza valgono soltanto per i formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere? Oppure bisogna pensare che i formaggi sono stati da me esaminati quando le altre specie di lievito erano rappresentate in numero scarsissimo? Che la diversità del risultato da me ottenuto sia da imputarsi al substrato di cultura è assolutamente da escludere perchè la gelatina al mosto d'uva è un terreno che risponde benissimo per l'isolamento dei lieviti e si può dire, anzi, che soltanto i *Debaryomyces* vi producono uno sviluppo piuttosto scarso, perchè, com'è noto, questi lieviti crescono rigogliosissimi sui terreni ricchi di proteine. E' quindi indubbio che nei formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere i lieviti che predominano sono da riportare alla specie *Deb. tirocola*. Verranno al più presto condotte indagini sugli stessi formaggi, ma di preparazione recentissima, di pochi giorni e di poche settimane, allo scopo di confermare o meno i risultati ottenuti.

Le ricerche eseguite hanno dimostrato che il contenuto in lieviti non è molto elevato e che esso diminuisce decisamente col progredire della stagionatura. Qual'è la funzione che i *Debaryomyces* esplicano nella maturazione del formaggio? Com'è noto i lieviti da riportarsi al genere *Debaryomyces* si riscontrano generalmente nella carne. Cesari (17), Cesari e Guilliermond (18) Mrak e Bonar (19), Mrak e Bonar (20), Castelli e Sisani (21) ed infine Giovannozzi (22) li ha riscontrati in gran numero nella fermentazione dei tabacchi pesanti italiani.

Le cifre di *Debaryomyces* riscontrate non sono apparse molto elevate ma a questo riguardo necessita ricordare che le prime conte sono state eseguite circa un mese dopo la preparazione dei formaggi. Sarebbe stato pertanto molto utile eseguire le medesime indagini anche su prodotti molto freschi, ma come è stato già accennato, dette ricerche verranno condotte al più presto. Qualora le quantità di *Debaryomyces* riscontrate fossero state notevolmente più elevate quali modificazioni avrebbero potuto portare nei formaggi in considerazione? Onde dare una qualche risposta ad i vari interrogativi è stato eseguito qualche saggio, che va inteso in senso semplicemente orientativo, e precisamente uno stesso latte misto di pecora e vacca è stato diviso in due porzioni una delle quali è stata caseificata col procedimento normalmente in uso, mentre all'altra è stata aggiunta una certa quantità di lievito in pasta umido, ottenuto raccogliendo patine di *Debaryomyces tirocola* sviluppate su agar di malto per cinque giorni a 25°.

I formaggi ottenuti vennero poi mantenuti nelle stesse condizioni e subirono le identiche manipolazioni. I saggi eseguiti su detti formaggi sono stati, più che altro, di indole organolettica ma sono state eseguite anche conte di blastomiceti mettendo in opera la tecnica già descritta. Per ciò che riguarda i caratteri organolettici le differenze sono apparse molto scarse e particolarmente nei primi due mesi esse erano del tutto trascurabili. Nel prosieguo della maturazione i formaggi ottenuti con immissione di lievito si presentavano più dolci, meno sapidi, ma di gusto certamente più delicato, a riguardo della tessitura interna però essi si presentavano meno uniformi ed anche all'aspetto esterno le forme si mostravano leggermente rigonfie.

I risultati ottenuti dalle conte si possono così riassumere: nell'analisi dei prodotti freschissimi, come dei primi due mesi, le cifre riscontrate nei formaggi ottenuti con immissione di culture di Deb. tirocola erano molto elevate (15-20 milioni di grammo di materiale) e molto superiori a quelle messe in evidenza nei formaggi ottenuti in maniera normale. Dopo il quarto mese però, le conte sono state eseguite fino al sesto mese, le cifre riscontrate si potevano considerare identiche.

Non è facile dare una spiegazione del tardivo, sia pur leggero, rigonfiamento osservato nei formaggi ottenuti con l'aggiunta di Deb. tirocola. Sia per l'incapacità del detto germe a fermentare gli zuccheri come perchè il leggero rigonfiamento appare oltre il secondo mese della preparazione, è da escludersi che il gas provenga dall'attacco del lattosio. Tutto fa pensare che la produzione di gas derivi dall'attacco di altri costituenti e più che altro dalla degradazione della caseina!

Se l'aspetto esteriore dei formaggi ottenuti in maniera normale era migliore di quello che si osservava nei prodotti con aggiunta di Deb. tirocola, è stato detto che questi ultimi si presentavano più dolci e di gusto certamente più delicato. Riuscirà quindi di una certa utilità agire ancora sull'argomento eseguendo un maggior numero di indagini microbiologiche e correderle di analisi chimiche. Detto lavoro verrà iniziato al più presto.

RIASSUNTO

Vengono riferite indagini microbiologiche a riguardo delle forme e della quantità di lieviti presenti in formaggi prodotti nell'alta valle del Tevere e preparati sia con latte di pecora, come di vacca o dalla mescolanza dei due. Il genere di blastomiceti predominante è il genere *Debaryomyces* Klocker e la specie, quasi costantemente presente, il Deb. tirocola Konokotina.

SUMMARY

The author relates about investigations concerning types and quantities of yeasts existent in the cheeses which are produced in the high Tiber valley and prepared through sheep's milk or cow's milk or through a mixture of both of them.

The genus of yeasts, which is prevailing, is the genus *Debaryomyces* and the species, which is nearly always present, is the Deb. tirocola Konokotina.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Korolev: citato da Sacchetti (vedi n. 3).
- (2) Sacchetti: « Archiv für Mikrobiologie », 3 Band, 5 Heft., 1932.
- (3) Sacchetti: « Archiv für Mikrobiologie », 4 Band, 3 Heft., 1933.
- (4) Luchetti e Nanni: « Nuovi Annali dell'Agricoltura », XV, 1935.
- (5) Luchetti: « Atti Soc. Toscana Scienze Naturali », vol. 46, n. 3, 1936.
- (6) Traetta, Mosca e Navone: « An. Chim. Appl. », vol. 7, 1923.

- (7) Dalla Torre: « Ann. Ist. Sper. Caseif. Lodi », vol. 4, 1929.
- (8) Esten e Mason: « Agric. Exp. Stat. Pensilvania Bull. », 15, 1883.
- (9) Eduard: « Science », 1913.
- (10) Beijerinck: « Bot. Zeitung », 1891.
- (11) De' Rossi: *Rel. IV Congr. Int. della Vigna e del Vino* - Lausanne, 1935
- (12) Castelli: « Nuovi Annali dell'Agricoltura », 1939.
- (13) Stelling-Dekker: *Die Sporogenen Hefen. Uigave Van de Koninklijke Akad. van Vetenschapen.* - Amsterdam, 1931.
- (14) Lodder: *Die Anaskosporogenen Hefen (Erste Halfte)* - N. V. Noord-Hollandsche Huitgevrsmatchappij, Amsterdam, 1934.
- (15) Lodder e Diddens: *Die Anaskosporogenen Hefen (Zweite Halfte).* - N. V. Noord-Hollandsche Huitgeversmaatchappij, Amsterdam, 1942.
- (16) Konokotine: « Bull. Jardin Bot. St. Petersburg », vol. 13, 1913.
- (17) Cesari: « Compt. Ren. Akad. des Sc. », vol. 168.
- (18) Cesari e Guilliermond: « Ann. Inst. Pasteur », vol. 34, 1930.
- (19) Mrak e Bonar: « Food Research. », vol. 3, 1938.
- (20) Mrak e Bonar: « Cent. f. Bakt. », 2 Abt., Band. 100, 1939.
- (21) Castelli e Sisani: Ricerche di prossima pubblicazione.
- (22) Giovanozzi: « Boll. Tecnico Scafati », 3-4, 1941.

(Pervenuto in redazione il 18-2-47)