

STUDI SASSARESI

Sezione III

1976

Volume XXIV

ANNALI DELLA FACOLTÀ DI AGRARIA DELL'UNIVERSITÀ
DI SASSARI

DIRETTORE: O. SERVAZZI

*COMITATO DI REDAZIONE: M. DATTILO - F. FATICHENTI - L. IDDA - F. MARRAS
A. MILELLA - P. PICCAROLO - A. PIETRACAPRINA - R. PROTA - G. RIVOIRA
R. SATTA - C. TESTINI - G. TORRE - A. VODRET*



ORGANO UFFICIALE
DELLA SOCIETÀ SASSARESE DI SCIENZE MEDICHE E NATURALI

GALLIZZI - SASSARI - 1977

St. Sass. III Agr.

Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica "A. Capriotti"
dell'Università di Sassari
(Direttore inc.: Prof. FABRIZIO FATICHENTI)

F. FATICHENTI, P. DEIANA e G.A. FARRIS

**Su alcuni fattori di sviluppo del "flor"
di *Saccharomyces bailii* Lindner (*)**

Alla specie *Saccharomyces bailii* Lindner, secondo Lodder (1970), appartengono due varietà:

Saccharomyces bailii Lindner var. *bailii*

Saccharomyces bailii Lindner var. *osmophilus* van der Walt nov. var.

La seconda si differenzia dalla prima soprattutto perchè capace di crescere in un mezzo con il 60% di glucosio.

Fra i principali sinonimi della varietà *bailii* possiamo ricordare *Zygosaccharomyces bailii* Lindner (Guilliermond), *Zygosaccharomyces acidifaciens* Nickerson e *Saccharomyces acidifaciens* (Nickerson) Lodder et Kreger-van Rij.

L'unico sinonimo certo per la varietà *osmophilus* è invece *Saccharomyces acidifaciens* Lodder et Kreger-van Rij var. *halomembranis* nom. nud.

La storia di questa specie di lievito, piuttosto lunga e controversa, può essere così brevemente riassunta: nel 1895 Lindner isolò un lievito da una birra fabbricata con un malto ad elevata concentrazione zuccherina (50° Balling), lo descrisse e gli impose il nome di *Sacch. bailii* in onore dello studioso Bail nativo di Danzica. Successivamente Guilliermond collocò questa specie di lievito nel genere *Zygosaccharomyces* creato da Barker nel 1901. Più tardi, Stelling-Dekker non riconobbe la validità di questo genere considerandolo invece un sottogenere del più vasto genere *Saccharomyces*.

Lodder et Kreger-van Rij nella prima edizione del loro « The Yeasts, a taxonomic study » del 1952, ripresero il concetto della Stelling-Dekker e lo ampliarono, giungendo a non riconoscere più neanche il sottogenere *Zygosaccharomyces*, per cui il nostro lievito tornò a chiamarsi *Sacch. bailii*.

(*) Lavoro eseguito con il contributo del C.N.R.

Egualemente fecero più tardi Novak e Zsolt, mentre Kudriavzev ritenne di dover conservare ulteriormente il genere *Zygosaccharomyces*.

Nel 1943, frattanto, Nickerson aveva isolato un lievito da un vino diventato aceto e lo aveva descritto come *Zygosaccharomyces acidifaciens*.

Ovviamente Lodder e Kreger-van Rij, nel testo già citato, classificarono questa specie come *Sacch. acidifaciens* e ne stabilirono l'identità con *Zygosaccharomyces manchuricus* Saito, isolato dal materiale di partenza per la fabbricazione di un brandy di sorgo e *Saccharomyces mestris* Marcilla e Feduchy, isolato da un sedimento di aceto.

Kudriavzev considerò inoltre *Zygosacch. acidifaciens* sinonimo di *Zygosacch. bailii* var. *galactosus*.

Un altro sinonimo di *Sacch. bailii* var. *bailii* è oggi considerato *Sacch. elegans*, descritto da Lodder e Kreger-van Rij nel 1952, che lo avevano isolato da un succo di mele.

Altro possibile sinonimo per la varietà *osmophilus*, oltre al già ricordato *Sacch. acidifaciens* var. *halomembranis*, potrebbe essere il *Saccharomyces elegans* varietà *intermedia* Verona e Zardetto de Toledo, specie isolata da macchinari enologici in Brasile, che però non è stata mai convalidata.

Da questa breve esposizione ed anche dalla scarsa letteratura specifica su *Sacch. bailii* questa specie appare sempre legata ad ambienti particolari nei quali è di solito elevata la concentrazione di zuccheri, alcool, SO₂ o acido acetico. La capacità a crescere su questi substrati sembra sia dovuta a delle speciali proprietà del plasmalemma (membrana citoplasmatica). Il suo potere alcoligeno è piuttosto modesto, poichè difficilmente da un fermentato si ottiene più dell'8-9% di alcool (w/v).

Il *Sacch. bailii* non viene considerato generalmente un lievito utile nell'industria delle bevande fermentate e del vino. Anzi gli si attribuisce il ruolo di agente di alterazioni, come hanno dimostrato anche di recente Rankine e Piloni (1973), a proposito di alcuni vini australiani bianchi e rosati imbottigliati, e Put (1976), che lo ha inserito fra le specie prese in considerazione in uno studio sulla resistenza al calore di determinati lieviti che alterano le bevande analcoliche.

Durante le ricerche sulle specie di lieviti presenti nel flor della Vernaccia sarda (Fatichenti, Melis e Capriotti, 1972) (Fatichenti e Farris, 1973) noi lo abbiamo ritrovato di frequente o da solo o associato con i lieviti flor tipici ed era perciò ovvio che questo ritrovamento stimolasse in noi il desiderio di conoscere meglio il *Sacch. bailii* visto come lievito flor e quindi come lievito potenzialmente utile.

Abbiamo allora fatto una prima prova di laboratorio utilizzandone 15 ceppi in una esperienza di invecchiamento biologico della Vernaccia sarda, da cui è risultato (dati in via di pubblicazione) che gli stipiti di *Sacch. bailii* hanno retto bene il confronto con quello degli stipiti di *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii* presi a testimoni. Più in particolare il metabolismo dei lieviti di tutte e tre le specie è apparso piuttosto simile se si considerano l'alcool, l'acidità fissa, gli acidi tartarico, malico e lattico, l'acidità volatile, il butilenglicole, il diacetile e l'acetoina, mentre il *Sacch. bailii* ha consumato meno glicerina e prodotta più acetaldeide degli altri due lieviti flor.

Risultati quindi molto positivi per il *Sacch. bailii* che richiedono, è ovvio, una conferma in cantina, anche se resta da definire l'optimum di alcuni fattori di sviluppo del flor.

E' proprio questa parte che abbiamo inteso affrontare nell'allestimento della esperienza di cui stiamo per riferire.

MATERIALI E METODI

Le diverse prove sono state effettuate impiegando i seguenti lieviti:

Sacch. bayanus: stipite n. 1425 della collezione di lieviti vinari dell'Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Perugia e 1007 e 1012 della nostra collezione di lieviti vinari;

Sacch. prostoserdovii: stipiti 1743, 1758 e 1798 della nostra collezione di lieviti vinari;

Sacch. bailii var. *bailii*: stipiti 109Z, 913Z, 1102Z, 1112Z, 1115Z, 202 Or, 205 Or, 501 Cb, 905 Cb, 932, 934 e 935 della nostra collezione di lieviti vinari.

Gli inoculi sono stati preparati con sospensioni cellulari ottenute lavando due volte in tampone fosfato colture sviluppate per 48 ore in agitatore rotante, in glucosio, peptone, estratto di lievito.

Per ciascun inoculo sono stati adoperati 0,1ml di sospensione contenente $2 \cdot 10^8$ cellule per ml.

La capacità a formare il velo è stata valutata in 200 ml di substrato contenuto in bottiglie di Roux da 1000 ml. Dopo l'inoculo le bottiglie sono state agitate leggermente e quindi poste in cella termostatica a 20 °C. E' stata scelta tale temperatura perchè è ormai accertato che questo è il valore

ottimale per ottenere il più rapido passaggio delle cellule dalla fase profonda a quella di flor.

Lo sviluppo del velo è stato seguito per il tempo necessario al suo completamento e comunque non oltre i 40 giorni.

Nelle diverse esperienze sono stati usati i seguenti substrati:

- Vino Vernaccia di Oristano di 6 mesi tal quale;
- idem più 1 g/l di estratto di lievito (Yeast Extract Difco);
- terreno sintetico così costituito: Yeast Nitrogen Base (Difco) 0,7%; infuso di thé nero 2,5%; alcool etilico assoluto 5%. L'infuso di thé si ottiene facendo bollire a bagno maria 3 g di thé nero in 100 ml di acqua per 5' (Martini, comunicazione personale);
- terreno sintetico più dosi crescenti (2-4-10-16-20%) di vino Vernaccia tal quale al 15% di alcool (w/v). Di questo alcool è stato tenuto conto in modo che nel substrato l'alcool totale fosse sempre pari al 5%;
- terreno sintetico più il 10% di vino Vernaccia come sopra e dosi crescenti di alcool etilico;
- terreno sintetico più il 10% di vino Vernaccia come sopra e dosi crescenti di SO₂.

L'uso del terreno sintetico è giustificato dalla opportunità di operare su un mezzo più facilmente ripetibile del vino.

Sia i terreni colturali a base di vino come quelli sintetici sono stati sterilizzati esclusivamente per filtrazione (Millipore 0,22 micron).

Il vino Vernaccia aveva la seguente composizione:

Alcool	15	%
Zuccheri residui	2,60	g/l
Acidità totale	4,40	g/l
Acidità volatile	0,44	g/l
Acidità fissa	3,85	g/l
Glicerina	10,00	g/l
2-3, Butilenglicol	0,95	g/l
Aldeide acetica	225	mg/l

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sviluppo del velo su vino

In precedenza avevamo già avuto modo di verificare che fra *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii* esistono solo modeste differenze per quanto

riguarda la velocità di formazione del velo sul vino e che il tipo di flor varia in seno alla stessa specie da stipite a stipite (Fatichenti, Farris e Maddau, 1975).

Cantarelli e Federici (1972) avevano inoltre constatato che l'estratto di lievito aggiunto al vino favorisce il passaggio delle cellule dalla fase profonda a quella di velo, mentre lo stesso reprime nettamente la formazione del flor nei terreni sintetici.

Le nostre esperienze hanno portato ai seguenti risultati:

A) *Sacch. bailii* forma il velo più lentamente dei lieviti flor classici (*Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii*).

Questi infatti compaiono in superficie dopo tre giorni dall'inoculo e dopo 9 giorni il flor è completo e abbondante. Non si notano differenze tra il vino tal quale ed il vino con estratto di lievito.

Il flor di *Sacch. bailii* compare invece, a seconda degli stipiti, tra 14 e 20 giorni e si completa dopo circa 30.

In pratica cioè il ritardo si accumula quasi del tutto nella fase iniziale, nella quale il lievito stenta ad adattarsi al nuovo ambiente.

Questo però avviene nel vino tal quale, poichè *nel vino con estratto di lievito il flor non si forma affatto*.

B) Il velo di *Sacch. bailii* è diverso da quello delle altre due specie: è infatti, in generale, più sottile, più scuro, più liscio, formato da grosse isole confluenti piuttosto che da una superficie unica e precipita ogni volta che diventa completo per poi riformarsi subito.

Anche in questa specie il tipo di velo appare comunque come una caratteristica variabile legata al ceppo.

Sviluppo del velo su terreno sintetico

Nel terreno sintetico tal quale *Sacch. bailii* non ha formato velo, mentre *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii* hanno florizzato rapidamente ed in maniera del tutto analoga a quanto avevamo visto nel vino.

Per indurre la florizzazione di *Sacch. bailii* abbiamo aggiunto allora al terreno dosi crescenti di vino Vernaccia comprese tra il 2 e il 20%.

A parte differenze di scarsa entità fra i ceppi, dalla prova è emerso che la dose minima perchè si formi velo in *Sacch. bailii* è del 4%, mentre quella ottimale, che consente cioè il completarsi del velo entro 10 giorni

dall'inoculo, è pari al 16%. Infatti con il 4% il velo diventa completo solo dopo un mese.

Da ciò appare chiara la diversità di comportamento di questo lievito, che abbisogna di un qualche fattore intrinseco del vino per poter formare velo su questo terreno sintetico, fattore intrinseco che è invece superfluo per i due lieviti flor classici, sempre, ovviamente, su questo terreno sintetico.

Sviluppo del velo in presenza di dosi crescenti di alcool

Nel terreno sintetico, più il 10% di vino (dose intermedia fra la minima e la ottimale vista in precedenza), sono state aggiunte quantità crescenti di alcool etilico assoluto in modo che la somma totale dell'alcool presente nel substrato fosse del 7-8-9-10-11-12-13-14-15-16%.

I risultati di questa prova, riferiti alla dose massima di alcool, sono riportati nel diagramma n° 1 in cui appare evidente che questa concentrazione alcoolica non inibisce lo sviluppo del velo, anche se lo rallenta soprattutto in *Sacch. bayanus* e *Sacch. protoserdovii*.

Infatti in essi i veli acquistano tutte le loro caratteristiche tipiche in un periodo compreso fra i 16 e i 19 giorni, mentre per la maggior parte degli stipiti di *Sacch. bailii* ciò accade fra i 9 ed i 12 giorni.

Alle concentrazioni inferiori invece il comportamento dei lieviti è decisamente differente. Infatti *Sacch. bailii* non appare influenzato fino alla concentrazione del 10%, al di sopra della quale la formazione del flor è invece rallentata, mentre le altre due specie non sembrano subire influenza negativa fino alla concentrazione del 15%.

Sviluppo del velo in presenza di dosi crescenti di SO₂

Nel terreno sintetico è stato aggiunto metabisolfito di potassio in quantità tali da ottenere le seguenti concentrazioni di SO₂ libera, determinate analiticamente dopo 4 giorni: 40, 60, 100, 130, 150, 180, 200, 260 mg/l.

I risultati sono riportati nel diagramma n. 2, dal quale risulta che, dopo 10 giorni, tutti gli stipiti di *Sacch. bailii* hanno florizzato regolarmente a concentrazioni comprese fra i 180 e i 260 mg/l, mentre gli stipiti degli altri due lieviti hanno florizzato fino alla dose massima di 100 mg/l.

Tutto ciò collima con quanto avviene in cantina dove abbiamo potuto osservare lo sviluppo di *Sacch. bailii* in fase flor anche in botti solforate con dosi molto prossime ai 200 mg/l.

L'insieme di questi risultati e di quelli ottenuti nella prova di invecchiamento della Vernaccia con stipiti di *Sacch. bailii* ci consentono di poter

considerare questa specie come un lievito flor tipico, che può essere impiegato nei processi di florizzazione soprattutto per vini fortemente alcoolici e solforati in sostituzione del *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii*.

RIASSUNTO

Da alcune prove intese a conoscere la velocità di formazione ed il tipo di flor su vino Vernaccia e la capacità a florizzare su terreno sintetico a base di thé, anche in presenza di concentrazioni crescenti di SO₂ e di alcool, emergono alcune interessanti diversità di comportamento fra gli stipti di *Sacch. bailii* e quelli dei lieviti flor più conosciuti *Sacch. bayanus* e *Sacch. prostoserdovii*.

Questi risultati, inoltre, assieme ad altri ottenuti in una precedente esperienza, rivelano la validità dell'impiego della specie *Sacch. bailii* nei processi di florizzazione della Vernaccia di Oristano.

SUMMARY

From several tests carried out to obtain the time of formation and type of flor on Vernaccia and the capacity to form film on synthetic medium with a tea base, even with the presence of growing concentration of SO₂ and of alcohol, some interesting differences in the behaviour of the strains of *Sacch. bailii* and the better known flor yeasts *Sacch. bayanus* and *Sacch. prostoserdovii*, are observed.

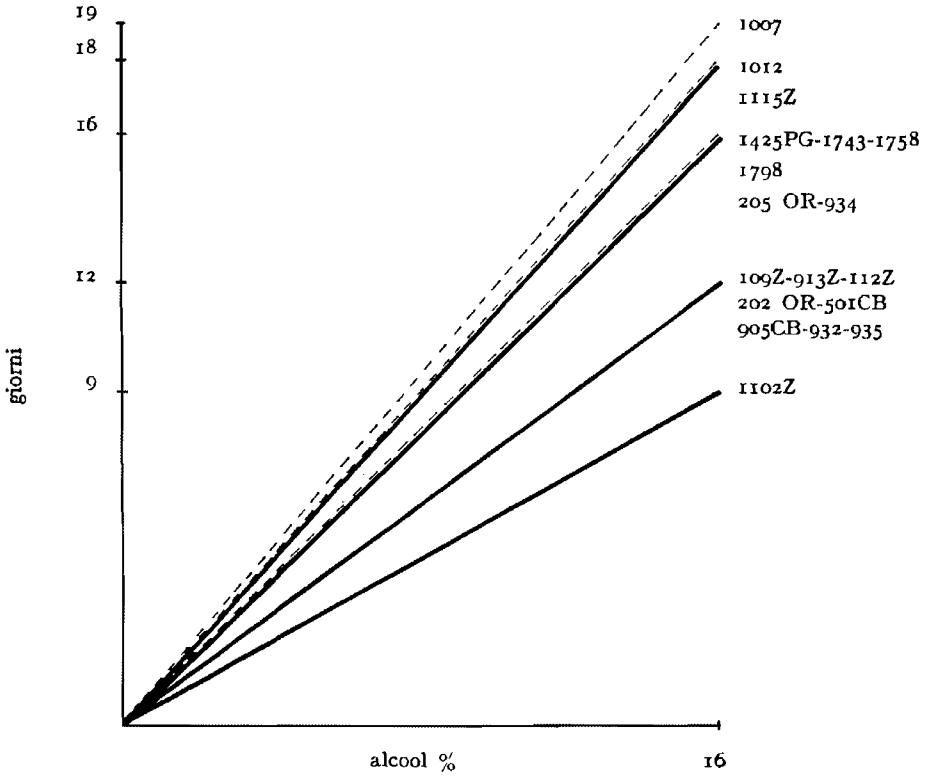
These results, moreover, with others already obtained in previous experiments, show the validity of the use of the species *Sacch. bailii* in the processes of the ageing of the "Vernaccia di Oristano".

BIBLIOGRAFIA

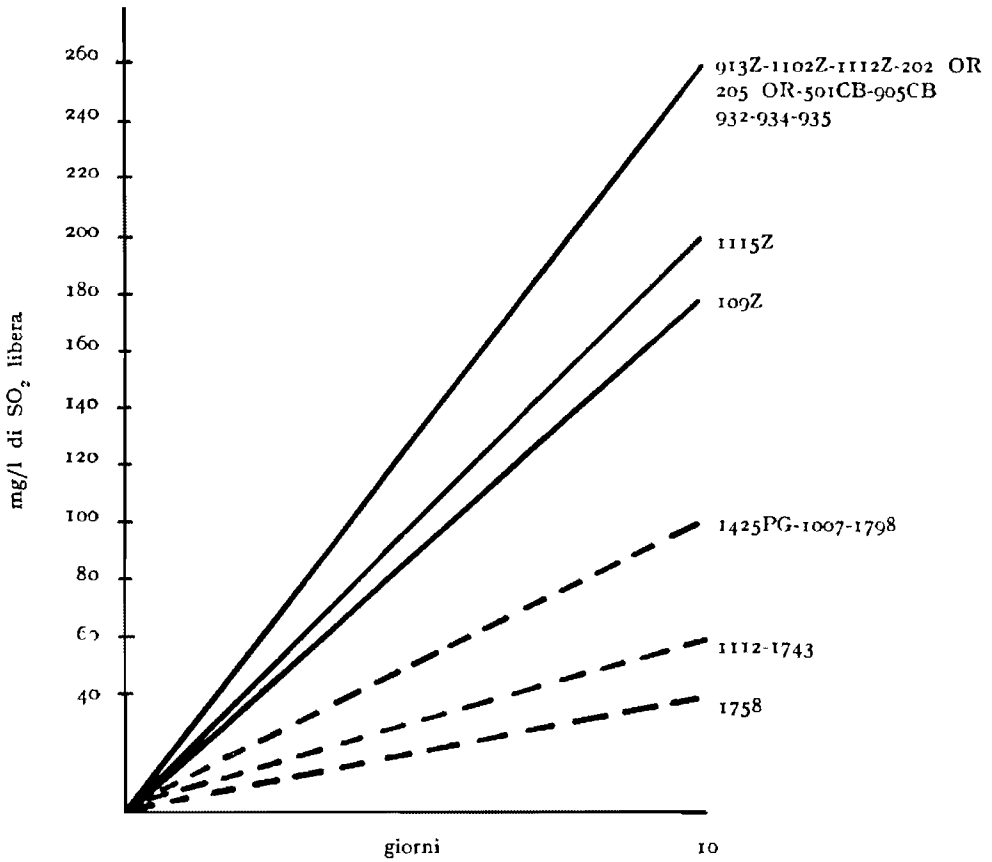
- CANTARELLI C. e FEDERICI F., 1972 — *Sui fattori di sviluppo sul vino del velo "flor" (Sacch. oviformis Ost.)*. Scienza e Tecnologia degli Alimenti, 2, 167-171.
- FATICENTI F. e FARRIS G.A., 1973 — *Indagini microbiologiche sulla Vernaccia sarda. Nota III. I lieviti del flor nelle zone di Baratili, Cabras, S. Vero Milis e Zeddiani*. Vini d'Italia, XV(83), 136-138.
- FATICENTI F., MELIS P. e CAPRIOTTI A., 1972 — *Indagini microbiologiche sulla Vernaccia sarda. Nota II. I lieviti del flor nella Cantina Sociale della Vernaccia di Oristano*. Vini d'Italia, XIV(80), 391-393.
- FATICENTI F., FARRIS G.A. e MADAU G., 1975 — *Selezione di alcuni stipti di Sacch. bayanus e Sacch. prostoserdovii per la fermentazione e l'invecchiamento controllati della Vernaccia di Oristano*. Vini d'Italia, XVII(97), 267-277.

- LODDER J., 1970 — *The Yeasts* 2nd ed. North Holland Publishing Co., Amsterdam, London.
- PUT H.M.C., DE JONG J., SAND F.E.M.J. e VAN GRINSVEN A.M., 1976 — *Heat resistance studies on yeast spp. causing spoilage in soft drinks*. Journal Applied Bacteriology, 40, 135-152.
- RANKINE B.C. e PILONE D.A., 1973 — *Saccharomyces baillii, a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine*. American Journal of Enology, 24, 55-58.

Fig. 1: Sviluppo del flor in presenza del 16% di alcool.



Sacch. bailii —————
 Sacch. bayanus e Sacch. prostoserdovii - - - - -

Fig. 2: Sviluppo del flor in presenza di dosi crescenti di SO₂.

Sacch. bailii

Sacch. bayanus e Sacch. protoserdovii

—————

- - - - -