

Contributo alla ecologia dei lieviti *Schizosaccharomyces* sulle uve

di

G. FLORENZANO, W. BALLONI e R. MATERASSI

A contribution to the ecology of fission yeasts on grapes

S u m m a r y . — The results of a preliminary investigation on the distribution of fission yeasts on grapes in western Sicily, carried out with a new selective enrichment method for *Schizosaccharomyces pombe*, are reported.

Fission yeasts have been found on 26 out of the 68 samples examined, belonging chiefly to the Zibibbo, Catarratto, Inzolia, Grillo and Grecanico cultivars. It has been shown that on Zibibbo grapes these yeasts are the main group among the epiphytic blastoflora.

Most of the 42 strains isolated from Sicilian grapes have been classified as *Schizosaccharomyces pombe*. Some of them show remarkable physiological and biochemical properties from the oenological point of view.

The results reported here show that, in the region considered in this work, fission yeasts must be included among the normal components of the microflora of grapes. On the other hand, it is reasonable to assume that the failure in the detection of *Schizosaccharomyces* on grapes by previous investigators should be ascribed to an inadequate experimental procedure.

Introduzione

La maggior parte delle ricerche sulla zimologia delle uve e dei mosti è stata informata alla esigenza di acquisire le conoscenze di base sulla natura dei principali agenti responsabili della fermentazione vinaria nelle diverse zone enografiche italiane e straniere (CASTELLI 1948, FLORENZANO 1949, VERONA 1951, PEYNAUD e DOMERCO 1953, CASTELLI e IÑIGO LEAL 1958, MINÁRIK 1965, etc.). Ciò ha richiesto l'applicazione nell'isolamento del criterio della dominanza e frequenza delle specie capaci di crescita rapida sugli ordinari mezzi di coltura dei lieviti.

Le tecniche d'indagine impiegate sono risultate conseguentemente inadeguate a fornire un quadro esauriente della complessa ecologia dei lieviti sulle uve e nell'ambiente del vigneto, come quello delineato negli studi dettagliati di DAVENPORT (1969, 1972, 1974) e nelle ricerche di BELIN (1972). Quest'ultimo ha individuato, mediante microscopia elettronica a scansione, nelle lenticelle, peduncoli, stomi, etc., altrettante nicchie di insediamento elettivo di determinate forme blastomicetiche, in corrispondenza di particolari essudati. L'A. ha formulato una critica dei tradizionali metodi di studio zimologico, in quanto incapaci di evidenziare la presenza di molte specie, le quali, anche se secondarie, possono costituire tuttavia una porzione significativa dell'intera popolazione blastomicetica delle uve.

Fra le specie blastomicetiche sfuggite alla ricerca zimologica convenzionale, degne di nota sono quelle dei generi *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces*. I lieviti *Brettanomyces*, segnalati sulle uve da VERONA e FLORENZANO (1947) e FLORENZANO (1951,

1952), furono, negli anni successivi, riscontrati nei mosti e nei vini da altri AA. (SCHANDERL e DRACZYNSKI 1952, PEYNAUD e DOMERCQ 1956, VAN DER WALT e VAN KERKEN 1958 etc.). Ma solo con la messa a punto di un mezzo selettivo ad opera di VAN DER WALT *et al.* (vedi PHAFF *et al.* 1966, p. 104—105) divenne possibile valutare la reale diffusione di tali lieviti nei mosti e nei vini.

Un caso analogo si è verificato per i lieviti del genere *Schizosaccharomyces*, che hanno suscitato l'interesse enologico per la capacità di fermentare l'acido malico (PEYNAUD e SUDRAUD 1964, CASTELLI e HASNEDARI 1968, 1971, BALLONI *et al.* 1970, FLORENZANO 1972, BENDA 1974, BIDAN *et al.* 1974, HASNEDARI 1976). Tali lieviti non risultavano fra i componenti normali della microflora blastomicetica delle uve e dei mosti, poiché la loro distribuzione sembrava limitata a substrati molto zuccherini e ad habitat tropicali, fino a che non fu segnalata la predominanza di *Schizosaccharomyces pombe* su uve venezuelane (BALLONI *et al.* 1966). Successivamente schizolieviti furono isolati da mosti d'uva dei Castelli Romani (BALLONI *et al.* 1970), da sedimenti di vini toscani della zona di Certaldo-S.Gimignano (FLORENZANO 1972) e, più recentemente, da campioni di vino provenienti dal modenese (1975, reperti non pubblicati).

Altre segnalazioni sono state fatte da BRUGIRARD (vedi BIDAN *et al.* 1974, p. 684) su mosti d'uva francesi della zona dei Pirenei orientali, da RELAN e VYAS (1971) su uve della regione indiana di Haryan e da DAVENPORT (1974) nel citato studio ecologico su un vigneto di Long Ashton in Inghilterra.

I ripetuti ritrovamenti di schizolieviti sulle uve e nei vini in regioni temperate postulano una radicale revisione dei concetti sulla ecologia dei lieviti *Schizosaccharomyces* e pongono il problema della individuazione delle cause che hanno fatto passare così a lungo inosservato questo gruppo blastomicetico nelle ricerche zimologiche. A tale riguardo è importante rilevare che gli schizolieviti hanno un tasso di crescita decisamente inferiore a quello dei comuni lieviti vinari e che le esperienze di colture miste hanno dimostrato come essi risentano in modo particolare gli effetti sfavorevoli della competizione con altre specie blastomicetiche (FLORENZANO 1972). Ne consegue che la messa in evidenza degli schizolieviti richiede l'adozione di mezzi di coltura e condizioni di incubazione nettamente selettivi che pongano tali lieviti in netto vantaggio rispetto alla microflora blastomicetica associata.

Nella presente nota vengono esposti i risultati di una indagine sulla distribuzione dei lieviti *Schizosaccharomyces* sulle uve della Sicilia occidentale, che dimostrano come la messa in evidenza di tale gruppo blastomicetico è legata in larga misura all'impiego di una appropriata tecnica di ricerca zimologica.

Materiali e metodi

L'indagine è stata condotta negli anni 1974 e 1975 ed ha interessato complessivamente 68 campioni (66 di uve e 2 di mosti concentrati) prelevati presso aziende vitivinicole delle province di Palermo, Trapani e Agrigento.

I campioni, una volta giunti in laboratorio, sono stati ammostati negli stessi contenitori, travasando il mosto ottenuto, previa separazione dei raspi, in matracci sterili.

La ricerca degli schizolieviti è stata condotta, oltre che con la tecnica usuale basata sulla semina di appropriate diluizioni seriali del campione da esaminare su agar malto in scatole Petri, con un metodo selettivo per *Schizosaccharomyces pombe* recentemente messo a punto da BALLONI e PELOSI (1977). La selettività è stata ot-

T a b e l l a 1

Caratteristiche dei campioni esaminati e distribuzione degli schizolieviti sulle uve della Sicilia occidentale

Characteristics of the samples examined and distribution of fission yeasts on grapes of western Sicily

Località	Cultivar	N° cam- pioni	Composizione chimica (media)		Schizolieviti presenti	
			zuccheri %	acid. tot. g/l	su agar malto	su mezzo selettivo
Valledolmo (Palermo)	Inzolia	2	21,5	5,00	—	1
	Primitivo di Gioia	1	18,4	5,10	—	—
	Trebbiano	2	19,0	6,30	—	—
	Catarratto lucido	3	18,5	7,90	—	—
	Zibibbo	1	24,0	6,40	—	—
Partinico (Palermo)	Catarratto comune	3	21,5	6,30	—	1
	Inzolia	2	22,5	5,10	—	1
Castelvetrano (Trapani)	Catarratto comune	2	21,3	6,10	—	1
	Trebbiano	3	19,1	7,30	—	—
	Grecanico	3	20,3	6,70	—	1
	Grillo	3	22,8	6,70	—	1
Pantelleria (Trapani)	Zibibbo	5	24,2	5,75	2	5
	Zibibbo (mosto conc.)	2	66,0	8,40	1	2
Marsala — Ponte (Trapani)	Pignatello	2	19,2	6,20	—	—
	Damaschino	2	21,0	5,70	—	—
	Trebbiano	4	18,2	7,10	—	—
	Catarratto comune	2	20,0	5,70	—	1
	Grillo	3	23,7	5,20	—	2
Alcamo — Valdi- bella (Trapani)	Catarratto comune	3	19,2	7,20	—	—
	Inzolia	2	21,0	5,30	—	1
Marsala — Tor- retta (Trapani)	Catanese nera	2	21,5	6,30	—	—
	Inzolia	2	22,0	5,70	—	1
	Catarratto comune	3	20,8	5,30	—	2
	Grecanico	4	19,7	6,10	—	2
Sambuca (Agrigento)	Inzolia	2	22,3	4,25	—	1
	Trebbiano	2	18,2	7,13	—	—
	Catarratto comune	3	21,4	5,80	—	3

tenuta tenendo conto di alcune proprietà fisiologiche e biochimiche distintive degli schizolieviti, quali:

- capacità di utilizzare acido malico in anaerobiosi
- prototrofia per steroli in anaerobiosi
- relativa resistenza all'azione combinata dell' SO_2 e dell'actidione.

Conseguentemente il mezzo di coltura ha la seguente composizione: Bacto vitamin-free yeast base (Difco) 16,7 g; glucosio 90 g; acido L-malico 10 g; actidione 10 ppm; $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 50 ppm; tiamina cloridrato 1 ppm; nicotinamide 0,5 ppm; Ca-pantotenato 0,5 ppm; acido p-aminobenzoico 0,5 ppm; biotina 0,05 ppm; inositolo 7 ppm;

agar 20 g; acqua distillata 1.000 ml; pH 4. Le scatole Petri, dopo la semina, vengono incubate in anaerobiosi, realizzata nel modo descritto da KOCH (vedi MOSSEL *et al.* 1962).

La presenza di schizolieviti è stata determinata mediante esame microscopico delle colonie sviluppate sulle piastre dopo incubazione a 25 °C per 3—5 giorni (agar malto) e 8—12 giorni per il mezzo selettivo. La particolare morfologia dei lieviti del genere *Schizosaccharomyces* consente, come è noto, la loro discriminazione dalle altre forme blastomicetiche. E' da rilevare che sul mezzo selettivo per schizolieviti le colonie di questi risultano, dopo 10 giorni, più grandi di quelle degli altri lieviti e presentano un'area centrale di colore bruno-rossiccio. Tutto ciò rende più agevole la loro individuazione. Per l'identificazione dei ceppi di *Schizosaccharomyces* isolati dai vari campioni di uve sono state seguite le metodiche proposte da LODDER (1970).

Risultati

Nella Tabella 1 sono esposti i risultati dell'indagine zimologica sulla distribuzione dei lieviti *Schizosaccharomyces* sulle uve della Sicilia occidentale.

Impiegando il metodo selettivo, gli schizolieviti sono risultati presenti in 26 dei 68 campioni esaminati, 66 dei quali costituiti da uve e i rimanenti 2 da mosti concentrati di uve Zibibbo. Tale reperto è degno di nota, se si considera che su agar malto si è avuta in generale una risposta negativa. Infatti con tale substrato gli schizolieviti sono stati reperiti solo in due campioni di uve Zibibbo ed in uno di mosto concentrato delle stesse uve. Va rilevato che nei tre campioni risultati positivi su agar malto, l'esame microscopico aveva già evidenziato la prevalenza degli schizolieviti sugli altri componenti della microflora blastomicetica naturale.

Al contrario l'esame microscopico degli altri campioni non aveva permesso di rilevare la presenza di schizolieviti, il che indica che la selettività del metodo di

Tabella 2

Prospetto riassuntivo della distribuzione degli schizolieviti nelle diverse cultivar di uve siciliane

Summary of the data on the distribution of fission yeasts on the Sicilian grape cultivars

Vitigni	Totale campioni esaminati	Campioni nei quali sono presenti schi- zolieviti		N° ceppi isolati
		su agar malto	su mezzo selettivo	
Grecanico	7	—	3	5
Inzolia	10	—	5	8
Catarratto comune	16	—	8	23
Catarratto lucido	3	—	—	—
Grillo	6	—	3	5
Trebbiano	11	—	—	—
Catanese nera	2	—	—	—
Zibibbo	8	3	7	21
Damaschino	2	—	—	—
Primitivo di Gioia	1	—	—	—
Pignatello	2	—	—	—

ricerca di tali organismi è sufficiente a consentirne il ritrovamento, anche quando essi costituiscano una componente secondaria della microflora blastomicetica.

Per quanto concerne la distribuzione di *Schizosaccharomyces* sulle uve, si notano talune differenze evidenti fra le diverse varietà esaminate (Tabella 2). In generale le classiche varietà siciliane Catarratto, Inzolia, Grillo, Grecanico, Zibibbo annoverano gli schizolieviti fra i componenti normali della microflora epifitica. Ciò è vero in particolar modo per le uve a più elevato contenuto zuccherino quali Zibibbo e Grillo.

L'assenza di schizolieviti sugli 11 campioni di Trebbiano toscano, deve essere sottolineata, dato che questo vitigno è di recente introduzione nella viticoltura siciliana.



Schizosaccharomyces pombe ceppo 4Z; a sinistra, cellule vegetative in divisione; a destra, tipici aschi tetrasporei ($\times 750$).

Photomicrography of *Schizosaccharomyces pombe*, strain 4Z; left, dividing vegetative cells; right, typical asci with four ascospores ($\times 750$).

Nel corso dell'indagine ecologica si è proceduto all'isolamento di 62 ceppi di schizolieviti scelti in modo da costituire un campione rappresentativo delle diverse „cultivar“ e zone di provenienza dei campioni esaminati.

Dal punto di vista tassonomico, tutti i ceppi sono da riferire alla specie *Schizosaccharomyces pombe* (Figura), tuttavia sono state riscontrate differenze nella capacità ad assimilare alcuni composti del carbonio in diversi ceppi isolati e ciò richiede una più attenta valutazione della loro posizione sistematica.

La definizione delle principali proprietà fisiologiche e biochimiche in funzione ecologica dei ceppi isolati dalle uve siciliane è tuttora in corso. Tuttavia si può finora affermare che tali organismi presentano un insieme di proprietà nettamente differenti da quelle che la letteratura riporta come caratteristiche della specie *Schizosaccharomyces pombe* (PEYNAUD e SUDRAUD 1964, CASTELLI e HASNEDARI 1968, FLORENZANO 1972). A titolo di esempio si riportano le principali proprietà riscontrate nel ceppo 4Z di *Schizosaccharomyces pombe* isolato da uve Zibibbo: alcool 17,2%; glicerina 5,5 g/l; 2,3-butilen glicol 0,75 g/l; acido succinico 1,6 g/l; acidi volatili 0,4 g/l. Inoltre tale ceppo presenta l'insolita proprietà di fermentare più attivamente ad una temperatura di 18 °C anziché di 24 °C o 30 °C come accade per gli altri stipiti della stessa specie.

Conclusioni

I dati brevemente esposti, pur essendo il risultato di una prima sommaria ricognizione zimologica, oltre a costituire la prima segnalazione della presenza di lieviti del genere *Schizosaccharomyces* sulle uve siciliane, mostrano che gli schizolieviti rappresentano una delle componenti normali della microflora blastomicetica delle uve della Sicilia occidentale, che in taluni vitigni (uve Zibibbo di Pantelleria) acquista carattere di predominanza.

A parte il caso citato, gli schizolieviti sono da annoverare fra i componenti secondari della microflora blastomicetica delle uve. Ciò spiega il mancato ritrovamento di detti lieviti in precedenti indagini (CASTELLI e DEL GIUDICE 1953) e conferma la validità del metodo selettivo proposto per la ricerca di *Schizosaccharomyces*.

Il fatto che tali lieviti pur essendo diffusi sulle uve non siano predominanti nella fermentazione naturale dei mosti, dipende dalla loro incapacità a competere con i saccaromiceti (BUJAK e DABKOWSKI, vedi ROSE and HARRISON 1970, p. 45; FLORENZANO 1972).

La presenza, fra i ceppi isolati, di stipiti biochimicamente interessanti ai fini enologici (elevato potere fermentativo con oltre il 17% di alcool, bassa produzione di acidi volatili, temperatura ottima di fermentazione compresa fra 18 e 20 °C), indica la grande variabilità di comportamento biochimico degli schizolieviti e dimostra che una ricerca ecologica condotta a fondo presenta un interesse non solo teorico, ma anche applicato.

Riassunto

Vengono riferiti i risultati di una indagine preliminare sulla distribuzione dei lieviti del genere *Schizosaccharomyces* sulle uve della Sicilia occidentale, condotta con un nuovo metodo di arricchimento selettivo per *Schizosaccharomyces pombe*.

Gli schizolieviti sono stati riscontrati presenti in 26 dei 68 campioni di uve esaminate, appartenenti principalmente alle cultivar Zibibbo, Catarratto, Inzolia, Grillo e Grecanico. Sulle uve Zibibbo di Pantelleria tali lieviti costituiscono il gruppo dominante nell'ambito della microflora blastomicetica.

Fra i 62 ceppi di schizolieviti isolati, in massima parte riferibili a *Schizosaccharomyces pombe*, alcuni presentano interessanti proprietà fisiologiche e biochimiche ai fini enologici.

I risultati ottenuti indicano che, nella zona presa in considerazione, gli schizolieviti rappresentano una componente normale della microflora epifitica delle uve e fanno ritenere che la sporadica segnalazione di tale gruppo blastomicetico nelle ricerche di zimologia delle uve sia da attribuire ai metodi di indagine inadeguati.

Bibliografia

- BALLONI, W., FLORENZANO, G. e MATERASSI, R., 1966: Prima segnalazione su uve di *Schizosaccharomyces pombe*. Ric. Sci. 36, 1096—1098.
- — — e — — —, 1970: Ricerche sulla fermentazione malo-alcoolica nei mosti e nei vini. Atti Accad. Ital. Vite e Vino 22, 419—432.
- — e PELOSI, E., 1977: Un metodo selettivo di ricerca degli schizolieviti. Vini d'Italia 106, 27—30.
- BELIN, J. M., 1972: Recherches sur la répartition des levures à la surface de la grappe de raisin. Vitis 11, 135—145.
- BENDA, I., 1974: Les *Schizosaccharomyces* et leur effet désacidifiant en vinification. Colloque Intern. Oenol. d'Arc et Senans. Vignes et Vins N° Spec., 31—36.

- BIDAN, P., MEYER, J. P. et SCHAEFFER, A., 1974: Les *Schizosaccharomyces* en oenologie. Bull. O.I.V. 523, 682—692.
- CASTELLI, T., 1948: Gli agenti della fermentazione vinaria in diverse regioni italiane. Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano) 1, 8—15.
- e DEL GIUDICE, E., 1953: Gli agenti della fermentazione vinaria della Sicilia occidentale. Riv. Viticolt. Enol. (Conegliano) 10, 11, 12, 307—313, 338—352, 389—399.
- e HASNEDARI, S., 1968: Sulla degradazione dell'acido L-malico da parte di *Schizosaccharomyces pombe*. Vini d'Italia 55, 265—272.
- — —, 1971: Considerazioni sulla fermentazione malolattica. Risultati ottenuti sul quadriennio 1967—70. Atti Accad. Ital. Vite e Vino 23, 177—202.
- e IÑIGO LEAL, B., 1958: Los agentes de la fermentacion vinica en la region Manchega y zonas limitrofas. Ann. Fac. Agrar. Univ. Perugia 13, 3—20.
- DAVENPORT, R. R., 1969: The flora of a vineyard. Rept. Long Ashton Res. Sta., Univ. Bristol, 120—122.
- —, 1972: Microecology of yeast in a vineyard. Rept. Long Ashton Res. Sta., Univ. Bristol 154—155.
- —, 1974: Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. Vitis 13, 123—130.
- FLORENZANO, G., 1949: La microflora blastomicetica dei mosti e dei vini in alcune zone toscane. Ann. Sper. Agrar. 3, 887—918.
- —, 1951: Diffusione e significato enologico dei lieviti *Brettanomyces*. Atti Accad. Ital. Vite e Vino 3, 236—248.
- —, 1952: Ulteriori ricerche sui lieviti del governo dei vini in Toscana. Atti Accad. Ital. Vite e Vino 4, 1—17.
- —, 1972: Valutazione biochimica ed enologica dei lieviti maloalcolici. Ann. Accad. Agric. Torino 114, 159—194.
- HASNEDARI, S., 1976: Considerazioni sul processo di rifermentazione con *Schizosaccharomyces pombe* LINDER. Vini d'Italia 101, 110—114.
- LODDER, J., 1970: The yeasts. N. Holland Publ., Amsterdam.
- MALAN, C. E., 1954: I lieviti della fermentazione vinaria in Piemonte. Atti Accad. Ital. Vite e Vino 5, 477—510.
- MINÁRIK, E., 1965: Ecology of natural species of wine-yeasts in Czechoslovakia. Mikrobiologija 2, 29.
- MOSSEL, D. A. A., BECHET, J. et LAMBION, R., 1962: La prevention des infections et des toxoinfections alimentaires. C.E.P.I.A., Bruxelles.
- PEYNAUD, E. et DOMERCO, S., 1953: Etude des levures de la Gironde. Ann. Inst. Nat. Agron. (Paris) 4, 265—300.
- et — —, 1956: Sur les *Brettanomyces* isolés de raisins et de vins. Arch. Mikrobiol. 24, 266—280.
- et SUDRAUD, P., 1964: Utilisation de l'effet désacidifiant des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisins acides. Ann. Technol. Agric. 13, 309—328.
- PHAFF, H. J., MILLER, M. W. and MRAK, E. M. (Eds.), 1966: The life of yeasts. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass.
- RELAN, S. and VYAS, S. R., 1971: Nature and occurrence of yeasts in Haryana grapes and wines. Vitis 10, 131—135.
- ROSE, A. K. and HARRISON, J. S. (Eds.), 1970: The yeasts. Vol. III. Acad. Press, London.
- SCHANDERL, H. und DRACZYNSKI, M., 1952: *Brettanomyces*, eine lästige Hefegattung im flaschenvergorenen Schaumwein. Wein und Rebe 20, 462—470.
- VAN DER WALT, J. P. and VAN KERKEN, A. E., 1958: The wine yeasts of the Cape. I. A taxonomical survey of the yeasts causing turbidity in South African table wines. A. van Leeuwenhoek 24, 239—252.
- VERONA, O., 1951: Notizie sulla microbiologia dei vini di Sardegna. Ann. Fac. Agrar. Pisa 12, 123—146.
- — e FLORENZANO, G., 1947: Sulla presenza e l'intervento nella fermentazione vinaria di alcune specie di *Brettanomyces*. Ric. Sci. 17, 1401—1407.

Eingegangen am 8. 12. 1976

Prof. G. FLORENZANO
 Università di Firenze
 Istituto di Microbiologia
 Agraria e Tecnica
 Firenze
 Italia