

VI CONGRESSO INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA
ROMA 6-12 SETTEMBRE 1953

Segretario Gen.: E. BIOCCA

Presidente: V. PUNTONI

ATTI
DEL VI CONGRESSO
INTERNAZIONALE DI
MICROBIOLOGIA

VOLUME VII
SEZIONI XIX-XXII
N. 1 - 115

SEZIONE XIX - Microbiologia industriale e delle fermentazioni

SEZIONE XX - Microbiologia applicata all'igiene

SEZIONE XXI - Microbiologia del latte e degli alimenti

SEZIONE XXII - Microbiologia marina

VI CONGRESSO INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA
ROMA 6-12 SETTEMBRE 1953

Segretario Gen.: E. BLOCCA

Presidente: V. PUNTONI

ATTI

DEL VI CONGRESSO INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

VOLUME VII

SEZIONI XIX-XXII

N. 1 - 115

SEZIONE XIX - Microbiologia industriale e delle fermentazioni

SEZIONE XX - Microbiologia applicata all'igiene

SEZIONE XXI - Microbiologia del latte e degli alimenti

SEZIONE XXII - Microbiologia marina

PROPRIETÀ LETTERARIA RISERVATA

La pubblicazione degli Atti del VI Congresso internazionale di microbiologia ha presentato alcune serie difficoltà di ordine teorico e di ordine pratico, dovute alla complessità del Congresso stesso ed al numero molto elevato delle comunicazioni e delle discussioni.

A lato di contributi pregevolissimi sono stati inviati i testi di comunicazioni che non sarebbero degni di comparire accanto ai primi se non fosse prevalso il concetto della massima liberalità.

Tutti i lavori, seguiti dalle relative discussioni, sono stati inviati ai Presidenti di Sezione per la loro approvazione; il Comitato di redazione si è limitato a richiamare l'attenzione dei Presidenti su alcuni contributi poco raccomandabili, al fine di controllare se essi corrispondessero alle comunicazioni esposte in sede di Congresso.

Le bozze di stampa di tutti i lavori, seguiti dalle relative discussioni, sono state inviate agli Autori; la redazione degli Atti non può assumere responsabilità per eventuali errori tipografici dovuti a mancato rinvio delle bozze di stampa da parte degli Autori stessi.

Il Comitato di redazione non ha creduto opportuno di apportare proprie correzioni ad eventuali inosservanze delle regole di nomenclatura microbiologica e di citazioni bibliografiche, lasciando agli Autori la responsabilità dei loro testi.

La maggior difficoltà incontrata dal Comitato nella redazione è stata rappresentata dalla raccolta e dalla pubblicazione delle discussioni; alcuni fogli manoscritti sono stati decifrati con molto sforzo ed il Comitato si scusa di eventuali inesattezze perchè, ad evitare notevoli ritardi della stampa, non è stato possibile inviare le bozze agli oratori intervenuti nelle discussioni.

Gli Atti del Congresso sono stati riuniti in 7 volumi, raggruppando in ciascuno di essi le Sezioni nella forma più razionale, a giudizio del Comitato di redazione, ed obbedendo ad esigenze editoriali.

V. PUNTONI, *Presidente*

E. BLOCCA, *Segretario Gen.*

ATTI
DEL
VI CONGRESSO INTERNAZIONALE
DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE XIX

MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE E DELLE FERMENTAZIONI MICROBIOLOGIE INDUSTRIELLE ET DES FERMENTATIONS INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FERMENTATIONS

PRESIDENTE: H. LUNDIN (Stockholm)

VICE PRESIDENTI: R. BAESTLE (Gand)

B. BROWN (Nutfield, Surrey)

W. F. J. CUTHBERTSON (Greenford, Middlessex)

C. DE ROSSI (Roma)

M. LEMOIGNE (Paris)

F. MENDLIK (Rotterdam)

N. NIELSEN (Stockholm)

A. VON SZILVINYI (Wien)

T. WIKÉN (Zürich)

Segretario: T. CASTELLI

GLI AGENTI DELLA FERMENTAZIONE VINARIA

TOMMASO CASTELLI

(Istituto di Microbiologia Agraria e Tecnica dell'Università di Perugia, Italia)

Lo studio degli agenti della fermentazione vinaria è stato condotto, per lungo tempo, con criteri quasi esclusivamente naturalistici ed indi si è cercato di applicare all'industria vinaria i concetti derivati dalle numerose ricerche condotte nell'industria birraria.

In realtà le nostre maggiori conoscenze sugli agenti della fermentazione alcolica sono derivate dagli studi di E. C. Hansen e dei suoi collaboratori e da ricercatori tedeschi, cioè a dire da parte di studiosi di indiscutibile valore ma appartenenti a paesi ove la vite non viene affatto coltivata o la produzione del vino ha un'importanza economica limitatissima.

Con ciò non si vuole significare che nei paesi vinicoli per eccellenza quali la Francia, l'Italia e la Spagna siano mancate ricerche ben condotte che possono aver portato anche qualche utilità nel campo applicativo, ma dette indagini rivestono carattere sporadico e mancano assolutamente di coordinamento e di sistematicità.

L'A. si sofferma in maniera particolare sulle indagini condotte, da oltre un ventennio, nell'Istituto di Microbiologia agraria e tecnica dell'Università di Perugia e che hanno riguardato moltissime regioni italiane ed anche località straniere.

Dette indagini si debbono considerare iniziate da de' Rossi nel 1933 e condotte successivamente ed in maniera sistematica da Castelli e dai suoi collaboratori.

Prendendo, dapprima, in considerazione le località dell'Italia centrale ci si è spinti, successivamente, nel meridione e nella Sicilia ed indi nel settentrione d'Italia. Nel 1950 Castelli, invitato dal Research Council of Israel, si è recato in quelle località e vi ha condotto delle indagini. Nello stesso anno Cantarelli, ospite della stazione enologica di Bordeaux, ha eseguito ricerche su alcuni mosti della regione bordolese.

L'A. si sofferma sulle modalità tecniche messe in opera allo scopo di pervenire all'isolamento ed allo studio di quelle forme che per essere le predominanti nei vari momenti del processo fermentativo dovevano considerarsi come le responsabili della trasformazione in vino dei singoli campioni di mosto.

Da un numero molto notevole di mosti esaminati circa 500, sono state ottenute quasi 5.000 colture di lievito che sono state perfettamente identificate e su molte di esse vennero condotte indagini di indole chimica e biochimica allo scopo di eventuali applicazioni pratiche.

Da questo complesso, veramente, molto notevole di lavoro sono derivati diversi fatti che si possono così riassumere:

Gli agenti della fermentazione vinaria appartengono a molte specie, ma mentre il rinvenimento di alcune di esse rappresenta un fatto del tutto casuale, ve ne sono altre che si riscontrano quasi costantemente e con notevole percentuale di frequenza e pertanto debbono essere considerate come le responsabili della trasformazione del mosto in vino. Vi sono, però, altre specie come *Torulaspora rosei*, *Sacch. bayanus*, *Sacch. mangini*, *Sacch. oviformis*, *Sacch. uvarum*, *Sacch. italicus*, *Kloeckera magna*, *Torulopsis pulcherrima* ecc., che rinvenendosi nei mosti con una percentuale di frequenza tutt'altro che scarsa, non possono essere considerate estranee al normale e naturale svolgersi del processo fermentativo del mosto d'uva.

Profonde e nettissime differenze sono scaturite dal confronto dei risultati ottenuti nelle località a clima temperato e di quelle a clima caldo e molto caldo. Così è risultato evidente che mentre per le località del nord e centro Italia si riscontrano specie sporigene ed asporigene pressoché in uguale numero, man mano che si scende nelle zone a clima caldo aumentano le specie sporigene che nelle località a clima molto caldo prendono l'assoluto sopravvento.

All'inizio del processo fermentativo sono sempre i lieviti di forma apiculata che dominano, ma mentre essi, nelle località a clima temperato o poco caldo, debbono riferirsi esclusivamente a lieviti asporigeni del genere *Kloeckera*, nelle zone a clima caldo e molto caldo, essi debbono essere riportati, più che altro, a specie sporigene del genere *Hanseniaspora*.

Alcune specie si debbono considerare come caratteristiche di alcune zone mentre altre si ritrovano, pressoché con uguale diffusione, ovunque.

Il *Sacch. ellipsoideus* è, quasi, costantemente presente nei mosti in fermentazione ma la sua percentuale di frequenza aumenta passando dal nord al sud dell'Italia e cioè dalle località fredde a quelle calde.

Profonde differenze sono state osservate nei diversi stipiti appartenenti alla medesima specie sia a riguardo del chimismo fermentativo come della possibilità di bene operare a temperature molto diverse.

Ci si sofferma, infine, sulle realizzazioni pratiche che i risultati delle indagini condotte hanno permesso di realizzare.

2.

ÜBER DEN WUCHSSTOFFBEDARF DER KULTURWEINHEFEN

T. WIKÉN, O. RICHARD, H. SOMM und F. SULZER

(Institut für landw. Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidg. Techn. Hochschule, Zürich, Schweiz)

Kürzlich konnten Wikén und Richard einwandfrei zeigen, dass die Hypothese der auxo-heterotrophen Natur der Kulturhefen, welche auf Grund der Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen über die Brauerei-, Brennerei- und Bäckerhefen sowie über einige sogenannte wilde Hefen und Weinhefen aufgestellt wurde, eine unstatthafte Verallgemeinerung enthält. Beispielsweise besitzen die schweizerischen Kulturweinhefen «Fendant», «Herrliberg» und «Salenegg» den Charakter auxo-autotropher Organismen. Sie sind imstande, in ganz kurzer Zeit eine wuchsstofffreie synthetische Nährlösung zu assimilieren, welche neben Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle Ammonsulfat oder vitaminfreies Caseinhydrolysat als Stickstoffquelle enthält. Die Vermehrung findet längs einer normalen, rasch ansteigenden, schwach S-förmigen Wachstumskurve statt. Dabei ist die Vermehrungsgeschwindigkeit auf dem Ammonsulfat praktisch gleich gross wie auf dem Aminosäuregemisch. Ferner wird in beiden Fällen approximativ die gleiche maximale Ausbeute an Zellen erreicht. Im Falle der «Fendant»-Hefe ist in Gegenwart von (+)-Biotin oder meso-Inosit eine kleine, aber deutliche günstige Wirkung bemerkbar. Der fördernde Einfluss der Kombination beider Wuchsstoffe ist gleich gross oder ein bisschen grösser als die Wirkung des meso-Inosits allein. Bei den Rassen «Herrliberg» und «Salenegg» übt (+)-Biotin weder auf die Geschwindigkeit der Zellvermehrung noch auf die Höchstaussbeute an Zellen einen Einfluss aus. Dagegen bewirkt meso-Inosit eine bedeutende Stimulierung des Wachstums dieser beiden Heferassen. Die fördernde Wirkung des meso-Inosits kann nicht durch Zusatz von (+)-Biotin gesteigert werden. Adermin, Aneurin und (+)-Pantothensäure, einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zugesetzt, erwiesen sich bei den erwähnten drei Hefen als völlig inaktiv. Hier sei nur noch erwähnt, dass die Kulturweinhefen «Fendant», «Herrliberg» und «Salenegg» trotz ihrer ausgeprägten Auxo-Autotrophie äusserst empfindlich auf sehr kleine Mengen (+)-Biotin bzw. meso-Inosit reagieren, indem bereits 0,0025 γ des ersten und 0,25 mg des letzten Vitamins pro 1000 ml Substrat aktiv sind.

Andere schweizerische Kulturweinhefen wie «Dézaley», «Maienfeld Ia», «Spanien II» und «Ungarn I» sind auxo-heterotroph, indem sie die synthetischen

Nährlösungen, welche für die Vermehrung der auxo-autotrophen Weinhefen geeignet sind, erst nach Zusatz eines oder mehrerer Wachstoffs schnell und völlig assimilieren können. Dabei zeigt die Rasse « Ungarn I » eine ausgeprägte Biotin-Heterotrophie. Ihre Zellen können durch Zusatz von (+)—Biotin allein zur maximalen Vermehrung gebracht werden. Adermin, Aneurin, meso-Inosit und (+)—Pantothensäure, einzeln oder in verschiedenen Gemischen geprüft, üben keinen fördernden Einfluss auf das Wachstum dieser Hefe aus. Sie vermögen auch nicht die Wachstoffs Wirkung des (+)—Biotins zu steigern. Im Falle der Rasse « Maiefeld Ia » zeigt (+)—Biotin im Ammonsulfat-Substrat und bei mittlerer bis starker Impfung auch in der caseinhydrolysathaltigen Nährlösung nach einer gewissen Induktionszeit eine kräftige Wachstoffs Wirkung. Diese wird durch Zusatz von meso-Inosit oder (+)—Pantothensäure wesentlich gesteigert. Maximale Vermehrung ohne oder mit unbedeutender Induktionsperiode tritt aber erst in Substraten ein, welche eine Kombination der erwähnten drei Vitamine enthalten. Bei der Hefe « Maiefeld Ia » hat ferner (+)—Pantothensäure allein einen wachstumsfördernden Effekt und zwar in der mit vitaminfreiem Caseinhydrolysat versetzten Nährlösung. Dieser wird durch meso-Inosit gesteigert. Substrate, in welchen nur Adermin, Aneurin und meso-Inosit vorliegen, werden von der Rasse « Maiefeld Ia » bei schwacher bis mittlerer Impfung in angemessenen Zeiten nicht assimiliert. Der Wachstoffsbedarf der « Dézaley »-Hefe erinnert stark an denjenigen der Rasse « Maiefeld Ia ». Beispielsweise wird maximale Vermehrung erst durch ein Gemisch von (+)—Biotin, meso-Inosit und (+)—Pantothensäure ermöglicht. Bei der « Dézaley »-Hefe übt aber meso-Inosit allein bereits in sehr kleinen Konzentrationen eine gewisse Wachstoffs Wirkung aus. Die Hefe « Spanien II » zeigt ebenfalls maximale Vermehrung in Anwesenheit der Kombination von (+)—Biotin, meso-Inosit und (+)—Pantothensäure. Diese Kombination kann aber durch ein Gemisch von (+)—Biotin, Adermin und Aneurin ersetzt werden. Bei der Rasse « Spanien II » sind ferner die Kombinationen von (+)Biotin mit einem der Wachstoffs Adermin, Aneurin, meso-Inosit und (+)—Pantothensäure sehr wirksam.

Bezüglich des Bedarfs an Wachstoffs ist die Gruppe der Kulturweinhefen somit durch eine sehr grosse Heterogenität gekennzeichnet, wobei die Zahl der auxo-autotrophen Rassen sicher nicht gering ist.

Antonie van Leeuwenhoek, 17, 209-226 1951; 18, 31-44, 1952; 18, 293-315, 1952; 19, 279-299, 1953; Schweiz. Zeitschr. f. allg. Path. u. Bakt., 14, 560-566, 1951. Arch. f. Mikrobiologie, 1954 (in press).

DISCUSSIONE

(NIELS NIELSEN, Stockholm, Sweden).

Ist die Produktion der verschiedenen Vitamine durch Analyse der Nährlösung nach Abschluss des Wachstums untersucht worden?

Dadurch kann, wie durch « Titrierung » mit Anti-Vitaminen, die Fähigkeit der betreffenden Stämme Vitamine zu bilden näher untersucht werden. Die untersuchten Stämme haben wahrscheinlich

eine reduzierte Synthese-Fähigkeit, so dass sie eine Stellung zwischen den echten heterotrophen und echten autotrophen einnehmen.

(Risposta dell'Autore, T. WIKÉN).

Auxo-heterotrophe Hefestämme vermehren sich in den Substraten der Kulturen der von uns untersuchten auxo-autotrophen Hefen, nachdem die Zellen der letzten Stämme entfernt worden sind. Im übrigen wurde das Problem vorläufig nicht weiter untersucht, weil wir nur beabsichtigten, synthetische Substrate ausfindig zu machen, welche sich zur Züchtung von Hefematerial für Gärungs- und Atmungsversuche eigneten.

3.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VITAMINBEDÜRFNIS
HOMOZYGOTER PRESSEHEFESTÄMME (*S. CEREVISIAE* HANSEN)

A. SZILVINYI

(Institut für angewandte Mikrobiologie, Versuchsstation f. d. Gärungsgewerbe in Wien der Hochschule für Bodenkultur, Wien, Österreich)

Lindegren C. C. und Lindegren G. erkannten als erste die genetische Bedingtheit der Vitaminsynthese bei *S. cerevisiae* H. an der genetischen Segregation dieser Eigenschaft und weiterhin an der Vererbung dieser Fähigkeit bei der Hybridisation, wobei sowohl Mendel'sche Vererbung wie auch Abweichungen hiervon beobachtet wurde.

Nachden Szilvinyi und Gruber-Oberfeuchtnr bei einem Stamm von *S. cerevisiae* (Presshefestamm Upsala) die Zelldimensionen als durch polymere Gene bedingt fanden, erschien es von Interesse, das Vitaminbedürfnis bzw. die Fähigkeit zur Synthese der einzelnen Vitamine bei in Bezug auf Dimensionen homozygoten Stämmen zu untersuchen. Diese wurden durch strenge Inzucht erhalten.

Die Vitaminbedürfnisse wurden wie bei den von Szilvinyi (4. Kongress der European Brewery Convention in Nizza, 1953) untersuchten Stämmen von *S. carlsbergensis* H. ermittelt. Wie bei dieser Hefeart so eignete sich auch hier eine anorganische N-Quelle besser zur Feststellung des Vitaminbedürfnisses als eine organische N-Quelle.

Der diploide Ausgangsstamm hatte das Vitaminbedürfnis Biotin plus Thiamin und zeigte unter den Versuchsverhältnissen keine Hemmung durch irgendwelche Vitamine. In diesen Ansprüchen ist er gleich vielen anderen untersuchten Presshefestämmen. Bei weiterer Inzucht war bereits ab F₂, ob haploid oder diploid, als konstantes Vitaminbedürfnis Biotin plus (Thiamin + Pyridoxin) festzustellen. Hierbei ist in Betracht zu ziehen, dass mehrfach bei *S. cerevisiae* die Äquivalenz von Thiamin u. Pyridoxin nachgewiesen wurde, und die beiden Vitamine sich anscheinend gegenseitig vertreten können. In späteren Filialgeneration zeigen die Haplonten gegenüber den Diplonten ein gesteigertes Vitaminbedürfnis z. B. in F₅ die Haplonten ausser — Biotin plus (Thiamin + Pyridoxin) noch Nikotinsäure. An Hand einer

Tetradenanalyse durch 5 Generationen wird die Vererbung des Vitaminbedürfnisses diskutiert. Die in Bezug auf Grösse homozygoten Stämme sind es auch in Bezug auf Vitaminsynthese. Es wird die Möglichkeit aufgezeigt, durch Kreuzung homozygoter Stämme zu Stämmen bestimmter Vitaminproduktion zu gelangen, dies ist im Hinblick auf die Verwertung solcher Stämme zur Tierfütterung von einem gewissen Interesse.

4.

LA PRODUCTION D'ALCOOL ET LE RENDEMENT DE CROISSANCE
DE LA LEVURE DE BOULANGERIE CULTIVEE EN AEROBIOSEMAURICE LEMOIGNE, JEAN PAUL AUBERT et M^{lle} JACQUELINE MILLET*(Institut Pasteur, Paris, France)*

Depuis Pasteur, la fermentation alcoolique provoquée par la levure a fait l'objet de nombreux travaux. Malgré la valeur de beaucoup d'entre eux, les conclusions que l'on peut en tirer sont contradictoires.

Les essais faits avec des levures proliférantes, dans des conditions en général mal déterminées, donnent des résultats discutables. Ceux dans lesquels on a utilisé des levures non proliférantes et surtout des extraits enzymatiques, permettent de simplifier le problème et de définir plus exactement les conditions expérimentales. Mais celles-ci sont artificielles et, de ce fait, ces essais perdent en portée ce qu'ils gagnent en précision.

Nous avons repris cette question avec des levures de boulangerie proliférantes mais en milieu synthétique et dans des conditions aussi rigoureusement définies que possible. Les déterminations d'alcool, de glucose et d'opacité ont été faites toutes les heures. Nous avons constaté que, malgré une aération intense, dans des milieux contenant 0,2 pour cent de glucose, 75 pour cent des molécules de glucide subissent la fermentation alcoolique, 25 pour cent seulement servant à la synthèse de la levure.

Vers la sixième heure environ, le glucose étant épuisé, la croissance s'arrête quelque temps pour reprendre aux dépens de l'alcool formé. En fin d'expérience, après 24 heures, il n'y a plus ni glucose ni alcool. Une analyse faite seulement à ce moment aurait conduit à conclure que l'aération inhibe la fermentation alcoolique.

D'autre part, nous avons calculé le rendement en levure par rapport au glucose consommé et les taux de croissance avant et après épuisement du glucose. Les résultats permettent de conclure que, si l'alcool peut servir à la croissance, ce n'est pas un intermédiaire nécessaire pour l'assimilation du glucose par la levure.

La détermination du potentiel d'oxydo-réduction pendant la culture, montre que l'aération est suffisante.

D'autre part en substituant l'oxygène à l'air, on diminue bien la formation d'alcool, mais on ne l'arrête pas, et 40 pour cent des molécules de glucose subissent la fermentation alcoolique.

Cependant, dans ces conditions, l'alimentation en oxygène commence déjà à être nocive pour la levure. En effet, le taux de croissance diminue, le rendement en levure n'augmente pas et le glucose qui n'est pas transformé en alcool est complètement oxydé.

Le seul moyen d'arrêter la fermentation alcoolique et d'augmenter le rendement en levure est de diminuer la concentration en glucose.

Une carence partielle en phosphate ou en azote assimilable n'a pas d'action sensible pendant la période de croissance.

La température n'a, dans les conditions des essais, qu'une influence pratiquement nulle.

5.

STUDIES ON ASSIMILATION OF ASPARTIC ACID BY BREWER'S YEAST

H. GUTHENBERG, L. ENEBO and E. SANDEGREN

(Stockholm Brewing Co. and Division of Microbiology, The Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden)

The fermentation process in the production of beer is of exceedingly great importance to the quality of the beer, above all in regard to its tenability and palatability. In this respect the choice of yeast is an important factor for normal fermentation. The composition of the wort is also of great significance and above all the amino acids play an important part not only to the quality of the beer but also to the yeast growth, as they are the basic elements of the yeast proteins.

When yeast synthesizes proteins from amino acids different reactions may occur. In a survey of this problem Thorne (1) mentions four alternatives: the Ehrlich mechanism, the Stickland mechanism, transamination and intact assimilation.

The *Ehrlich mechanism* is a hydrolytic deamination and decarboxylation:



However the reaction may give rise to an acid and therefore the following intermediates are conceivable:

1. $R \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH} + \text{O} \rightarrow R \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH} + \text{NH}_3$
2. $R \cdot \text{CO} \cdot \text{COOH} \rightarrow R \cdot \text{CHO} + \text{CO}_2$
3. $R \cdot \text{CHO} + 2\text{H} \rightarrow R \cdot \text{CH}_2\text{OH}$
4. $R \cdot \text{CHO} + \text{O} \rightarrow R \cdot \text{COOH}$

According to 1. the amino acid is oxidatively deaminated causing the formation of an α -keto acid. The latter is decarboxylated according to 2., and the corresponding aldehyde is obtained. The final step may be a reduction or an oxidation of the aldehyde, leading to the formation of the corresponding alcohol or acid. An example of the former is the formation of isoamyl alcohol from leucine, whereas the formation of succinic acid from glutamic acid is an example of the latter way of reaction.