

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCVIII.

1911

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XX.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1911

Microbiologia casearia. — *Il comportamento dei batteri acidopresamigeni (acidoproteolitici) del formaggio di fronte alle temperature basse, in rapporto col loro intervento nella maturazione dei formaggi* (1). Nota del prof. dott. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio G. BRIOSI.

Come ebbi a dimostrare in precedenti lavori (2), in favore della mia opinione, che alla maturazione dei formaggi concorra quel gruppo fisiologico di schizomiceti da me svelato e introdotto nella letteratura sotto il nome di *batteri acidopresamigeni*, militano già due argomenti: 1°, la capacità di detti batteri di svilupparsi e peptonizzare la caseina anche in ambiente acido, per cui essi, specialmente dal punto di vista pratico, meritano la designazione di *acidoproteolitici*, a fine di distinguerli dai comuni batteri peptonizzanti (*Tyrothrix* di Duclaux ecc.), che attaccano la caseina solamente in ambiente alcalino o neutro (3); 2°, la presenza costante di specie appartenenti al detto gruppo batterico nei formaggi a pasta cotta (*Micrococcus casei acidoproteolyticus I e II*; *Bacillus casei acidoproteolyticus*) (4).

Nel presente lavoro intendo recare, a sostegno della mia tesi, un terzo argomento, e cioè: il comportamento dei batteri acidopresamigeni di fronte alle basse temperature. Di qui trarrò poi occasione di dirimere un'obiezione che ancora si vorrebbe avanzare contro l'importanza dei batteri stessi nel lavoro di maturazione dei formaggi.

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di batteriologia della R. Scuola sup. di agricoltura di Milano. Esso si riallaccia coll'altro mio lavoro sui presami microbici, che venne presentato all'Istituto Lombardo di Sc. e Lett. (V. Rend. 1908, pag. 122).

(2) V. segnatamente i miei lavori in: Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 1904, 37, p. 939; Rend. R. Acc. Lincei, 1905, XIV, 2° sem. e Rend. R. Acc. Lincei, 1910, XIX, pag. 150.

(3) Come già dissi altrove, questo argomento, che fu precisamente il punto di partenza della mia ipotesi, fu anche quello che valse a dirimere le obiezioni che si opponevano ad ammettere l'intervento di batteri peptonizzanti nella maturazione dei formaggi. Imperocchè queste obiezioni, com'è noto, si fondavano giustamente sulla considerazione che i batteri peptonizzanti, fino allora conosciuti, si mostravano ostacolati nel loro sviluppo dalla reazione acida che si ingenera in seno ai formaggi per opera dei fermenti lattici.

(4) Analogamente a quanto feci per i cocchi acidopresamigeni dei formaggi, designo con questo nome il bacillo acidopresamigeno del formaggio di Grana che descrissi in un lavoro precedente (Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 1904, vol. 37) e che dopo d'allora riscontrai anche nell'Emmenthal.

Il comportamento dei batteri acidopresamigeni di fronte alle basse temperature va considerato sotto due punti di vista: rispetto all'attività proliferativa dei batteri, e rispetto all'attività dei loro enzimi. Dico subito che tanto sotto l'uno, quanto sotto l'altro riguardo, questi batteri si rivelano dotati di proprietà singolarmente adattate per quella che possiamo chiamare *ibernazione dei formaggi*.

Se noi prendiamo in esame i vari tipi di formaggi a pasta cotta, vediamo che, qual più qual meno, essi vanno soggetti, durante la loro stagionatura, ad attraversare un periodo di temperature basse, intendo dire di temperature inferiori ai 10° C. Intanto, tutti i formaggi che si fabbricano d'inverno, non possono esimersi da questo passaggio; atteso che, anche quei tipi che maturano in pochi mesi e che vengono tenuti in stufa durante la prima fermentazione (tipi svizzeri in generale), restano esposti per qualche tempo, vuoi prima della stufatura vuoi dopo la stufatura, ai rigori della stagione. Ma dove l'ibernazione è particolarmente manifesta è in quei tipi di cacio, come il Grana, che impiegano due o più anni a maturare e che non sono sottoposti a stufature: è ovvio che questi caci devono forzatamente subire non uno, ma parecchi periodi di temperature basse. Io ebbi agio di constatare che, puranco nei magazzini di Grana i meglio riparati, la temperatura invernale scende talora al disotto dei 5° C.

Ora io mi sono domandato più volte se, durante una tale ibernazione, la flora nei formaggi sospendesse interamente la sua attività e rimanesse in stato latente, quasi di letargo, in attesa di riprendere la moltiplicazione e il funzionamento colla ricomparsa delle temperature favorevoli, oppure se essa subisse semplicemente un rallentamento di attività. Con tale mira ho sottoposto le diverse specie batteriche, che sono andate di mano in mano isolando dai formaggi di Grana, alla cultura in latte a varie temperature, scendendo fino attorno ai 5° C. Le specie isolate appartenevano in parte al gruppo dei fermenti lattici propriamente detti ⁽¹⁾, in parte a quello dei batteri acidopresamigeni. Ripetendo e prolungando convenientemente le prove, ho potuto verificare quanto segue: che i fermenti lattici propriamente detti amano, in generale, temperature piuttosto elevate, che stiano almeno attorno ai 20° C.; solamente qualche razza o varietà vegeta anche attorno ai 15° C., ma non troppo al disotto; che, all'incontro, i batteri acidopresamigeni, e segnatamente alcuni cocchi acido-proteolitici, prosperano anche al disotto dei 10° C. Le semine di questi cocchi in latte, tenute fra 5° e 8° C., non coagulano, è vero, ma presentano, in capo a 15-20 giorni, un processo di peptonificazione a reazione anfotera, cioè senza variare la reazione naturale del latte; laddove il medesimo germe coltivato a 20-30° C., comincia col coagulare il latte

⁽¹⁾ Non credo superfluo ricordare che per *fermenti lattici propriamente detti* si intendono quei batteri lattici che coagulano il latte con reazione acida, senza acrogenia, e senza successiva peptonizzazione.

in 24-48 ore con reazione decisamente acida, e successivamente lo peptonifica. Questo speciale comportamento dei batteri acidopresamigeni di fronte alle temperature basse, comportamento che li distanzia dai fermenti lattici propriamente detti, è importante in primo luogo perchè può essere utilizzato per la loro ricerca; è importante, poi, nella questione attuale, perchè permette di ritenere che, durante il periodo di ibernazione, la attività microbica in seno ai formaggi possa, almeno per quel che spetta ai batteri acidopresamigeni, continuare a mantenersi, sebbene rallentata e limitata.

Ancor più importante è il comportamento degli enzimi proteolitici dei batteri acidopresamigeni di fronte alle basse temperature; imperocchè detti enzimi si rivelano capaci di agire anche a temperature inferiori a quelle che sono compatibili collo sviluppo dei germi stessi. Ciò ho potuto dimostrare già in un altro lavoro a proposito di un batterio acidopresamigeno delle mammelle (*Bacillus minimus mammae*) che non si sviluppa guari al disotto dei 20° C. (1); ciò ho potuto altresì confermare rispetto ad altri batteri del genere, fra cui i cocchi ed i bacilli acidopresamigeni del formaggio. Se si prendono culture in latte di detti batteri, dopo che si sono ben sviluppate a temperatura favorevole, e le si mettono in ghiacciaia fra 0° e 5° C., si assiste ad una progressione lenta ma graduale della loro peptonizzazione, abbenchè la vita dei germi vi sia arrestata; sono evidentemente gli enzimi batterici che continuano la loro opera proteolitica, indipendentemente dalla proliferazione dei batteri stessi. Questo prova che l'azione enzimatica dei batteri acidopresamigeni è possibile anche nei periodi di ibernazione più profonda, anche quando tace completamente la vegetazione microbica.

Dal complesso delle mie ricerche sul comportamento dei batteri acidopresamigeni di fronte alle basse temperature è adunque lecito dedurre, che la loro azione, e segnatamente l'azione dei loro enzimi proteolitici, continui a spiegarsi anche durante i periodi di ibernazione dei formaggi nei magazzini di stagionatura.

Ciò, mentre costituisce un titolo di più in favore della importanza dei batteri acidopresamigeni o acidoproteolitici nella maturazione dei formaggi, si accorda anche colla teoria americana sulla stagionatura dei formaggi a temperature basse.

È noto infatti che, partendo dal concetto che nel processo di maturazione dei formaggi abbiano grande importanza gli enzimi naturali del latte (galattasi) e gli enzimi contenuti nel presame, e avendo constatato che questi enzimi agiscono anche a temperature basse, gli studiosi americani si sono dati già da tempo a prove di stagionatura dei formaggi in celle refrige-

(1) Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e lett. 1907, pag. 947 e 1908, pag. 122.

ranti⁽¹⁾; ciò nell'intento precipuo di evitare le alterazioni dei formaggi, che sono dovute a germi sviluppatissimi a temperature elevate o dell'ambiente. Non è mia intenzione di trattare qui una tale questione; solamente mi piace far notare che, qualora il metodo americano di stagionatura dei formaggi nei refrigeranti desse realmente buoni risultati, esso dovrebbe riconoscere nel comportamento dei batteri acidopresamigeni, e segnatamente dei loro enzimi, di fronte alle temperature basse, un valido fattore per la sua riuscita. Basterebbe, naturalmente, che i formaggi fossero messi nel refrigerante, dopo che si è verificato in essi una sufficiente moltiplicazione e invasione di batteri acidopresamigeni; il che, come si sa, si effettua già nei primissimi giorni di fabbricazione.

Ma, come dicevo in principio, le osservazioni sovraesposte offrono occasione altresì ad un altro ordine di considerazioni a sostegno delle mie vedute.

Abbiamo visto che l'azione enzimatica dei batteri acidopresamigeni è possibile anche quando questi si trovano in vita latente; ciò conduce a ritenere che essa sia possibile puranco quando la vita di questi è completamente spenta, quando cioè non rimangono che i cadaveri dei germi produttori e contenenti gli enzimi medesimi. In altri termini: per ammettere la collaborazione dei batteri acidopresamigeni nelle varie fasi di maturazione dei formaggi, non c'è bisogno di dimostrarli in vita perenne in seno ai formaggi; basta assicurarsi che essi vi abbiano esistito e vi si siano largamente sviluppati in precedenza; gli enzimi intra- ed extracellulari da loro prodotti, provvedono poi a continuare l'opera loro, come durante l'ibernazione, così anche *post mortem*. Viene così a cadere l'obbiezione, che i seguaci della teoria esclusivista di Freudreich avanzano tuttora contro la mia teoria. Essi, mentre riconoscono che nei primi giorni della fabbricazione dei formaggi si verifica uno sviluppo rigoglioso di batteri acidopresamigeni, fanno notare che, in seguito, questi batteri vanno diminuendo, lasciando il sopravvento ai fermenti lattici propriamente detti. Taluno anzi arriva a sostenere che ben presto i batteri acidopresamigeni scompaiono del tutto dai formaggi; ciò non è conforme al vero, come hanno dimostrato le mie ricerche, recentemente confermate anche da quelle di altri osservatori (Thöni⁽²⁾, Harding e Prucha⁽³⁾ ecc.), secondo le quali i batteri acidopresamigeni si incontrano anche nelle fasi di maturazione inoltrata.

Ad ogni modo, dopo quanto siamo venuti esponendo circa l'indipendenza di azione degli enzimi proteolitici dalla vita dei batteri che li hanno generati, l'accertamento vitale e numerico di detti germi ha importanza solamente

(1) V. specialmente i lavori di Babcock, Russel, Baer, Van Slyke, Smith, Hart ecc. nei Bollettini dell'*U. S. Department of Agriculture* 1903 e seg.

(2) Thöni, *Landw. Jahrb. d. Schweiz*, 1909.

(3) Harding e Prucha, *New-York Agric. Exper. Station, Bulletin* 8°, 1908.

nei primordii della maturazione; e su questo punto tutti gli autori sono oramai d'accordo nell'affermare che tutti i formaggi a pasta cotta presentano, nei primi giorni, una lussuosa invasione di cocchi acidopresamigeni.

Riassunto. — Le suesposte ricerche e considerazioni, che vengono in appoggio della mia teoria sull'intervento e sull'importanza dei batteri acidopresamigeni-proteolitici nel processo di maturazione dei formaggi, si possono riassumere come segue:

1. I batteri acidopresamigeni dei formaggi, e particolarmente alcuni cocchi acidoproteolitici, sono capaci di svilupparsi anche a temperature inferiori ai 10° C.; cosicchè essi, a differenza dei fermenti lattici propriamente detti, sono adatti per funzionare in seno ai formaggi anche durante i periodi di ibernazione di questi nei magazzini di stagionatura, come succede specialmente per i formaggi a lunga maturazione (Grana, Sbrinz ecc.).

2. Gli enzimi proteolitici dei batteri acidopresamigeni sono capaci di agire a temperature ancora più basse, cioè al disotto di 5° C., quando è presumibilmente arrestata la vita microbica in genere; cosicchè essi sono adatti a funzionare in seno ai formaggi anche durante periodi di ibernazione eccezionalmente freddi.

3. Le attitudini dei batteri acidopresamigeni e dei loro enzimi proteolitici si accordano adunque colle moderne vedute della scuola americana sulla possibilità di effettuare la stagionatura dei formaggi in magazzini refrigeranti.

4. L'attitudine degli enzimi proteolitici dei batteri acidopresamigeni di funzionare indipendentemente dalla vita dei batteri stessi, fa sì che, per ammettere l'influenza di detti batteri nelle varie fasi di maturazione dei formaggi, non c'è bisogno di dimostrarne la permanenza in vita durante tutte le singole fasi; basta dimostrare che essi hanno avuto un periodo abbastanza rigoglioso di sviluppo durante la fase iniziale, qual'è riconosciuto ormai da tutti gli autori per tutti i formaggi a pasta cotta; a continuare l'opera loro provvedono poi gli enzimi intra- ed extracellulari da essi generati.

E. M.