

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCIX.

1912

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXI.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI

1912

Microbiologia. — *Contributo alla differenziazione dei fermenti lattici* (1). Nota del prof. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio G. BRIOSI (2).

In batteriologia lattiera chiamansi *fermenti lattici* i batteri che producono la fermentazione lattica del lattosio. La serie di questi fermenti lattici, iniziata da Hueppe col suo *Bacterium acidi lactici*, è andata arricchendosi di numerosi componenti per opera di parecchi ricercatori; cosicchè è da tempo sentito il bisogno di una classificazione, o per lo meno di un coordinamento. Già vari autori si sono provati di soddisfare a tale bisogno; citerò fra i principali: Weigmann (3), Conn, Esten e Stocking (4), Löhnis (5), Rogers e Davis (6) ed altri. Con tutto ciò noi vediamo che gli sperimentatori male si adattano a catalogare i fermenti lattici da loro incontrati secondo l'una o l'altra classificazione; la più parte si inducono a darne la descrizione senza curarsi di identificarli coi precedenti o di differenziarneli, e bene spesso assegnano loro nuove denominazioni. Ciò può dipendere da diverse cause dirò così personali, quali la impurezza delle culture, l'insufficiente consultazione della letteratura, il desiderio di scoprire e battezzare cose nuove e via dicendo. Ma, fatte poche eccezioni, ritengo che le ragioni per cui tanto si stenta ad uniformare la classificazione dei fermenti lattici, debbano ricercarsi principalmente nei tre fatti seguenti:

- a) l'inadeguata durata delle osservazioni;
- b) il soverchio peso che in generale si dà alle proprietà morfologiche dei fermenti lattici;
- c) l'introduzione di criteri di classificazione che sono estranei al latte.

Svolgerò brevemente questi tre concetti.

A) Circa la durata delle osservazioni non ho che da richiamarmi a quanto già ebbi ad esporre in una pubblicazione precedente, sulla necessità che la fissazione dei caratteri dei microrganismi del latte venga fatta solamente in base ad accertamenti ripetuti e prolungati (7), essendo le qualità

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Batteriologia della R. Scuola Superiore di agricoltura di Milano.

(2) Pervenuta all'Accademia il 27 Novembre 1912.

(3) Centralbl. f. Bakter., Abt. 2^a, vol. V, 1899.

(4) Connecticut Agricult. Exper. Station, 18^o Annual Report, 1906.

(5) Centralbl. f. Bakter., Abt. 2^a, vol. XVIII, 1907.

(6) U. S. Department of Agriculture, Bureau of Animal Industry, Bull. 154, 1912.

(7) Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett., XL, 1907, pag. 947.

del latte suscettibili di sensibili variazioni sia ab origine, sia per cause inerenti alle alterazioni a cui va incontro il latte o prima di arrivare in laboratorio o nel laboratorio stesso a seconda della temperatura alla quale è spinto per la sterilizzazione, a seconda che la sterilizzazione data da minore o maggior tempo, e via dicendo. Aggiungerò che anche la dose della semente può influire sul comportamento di un batterio nel latte. Tutto ciò lo deduco dall'osservazione accurata di questo comportamento che vado facendo da anni sui trapianti periodici settimanali o al più quindicinali delle mie culture.

B) Anche circa il soverchio peso dato alle proprietà morfologiche dei fermenti lattici, non ho che da rincalzare quanto già accennai in precedenti scritti (1), e cioè che erroneamente alcuni autori tendono a stabilire un rapporto fra la forma e le attività fisiologiche (potere acidificante, filotermia ecc.) di detti fermenti, tanto più che non è sempre facile precisare la forma di questi microrganismi. Prova ne sia che uno stesso fermento è da alcuni Autori messo fra i cocchi, da altri fra i bastoncini, e che alcuni fanno tre gruppi morfologici di fermenti lattici, altri invece due soli. Ricordo anche le mie osservazioni sul *Bacillus minimus mammae* (2).

C) Veniamo al terzo punto: l'assunzione di criterî differenziali che sono estranei al latte. Molti autori per distinguere i fermenti lattici vanno ad indagare l'azione su terreni o materiali di nutrizione diversi dal latte, quali la gelatina, il glucosio ecc., vale a dire sopra albuminoidi o carboidrati che non sono nè la caseina nè il lattosio.

Ora, se in tesi generale per l'identificazione di un batterio è sempre utile possedere il maggior numero possibile di elementi, per il caso speciale della classificazione dei fermenti del latte parmi che il sistema di valersi di criterî estranei al latte venga a complicare anzichè agevolare il compito e in ogni caso presenta il pericolo di far passare in seconda linea ciò che deve stare in prima linea nei riguardi del latte e dei derivati. Ricordo a questo proposito le mie ricerche sui cocchi acido-presamigeni del formaggio (3); per questi cocchi è stato proposto da alcuni autori il nome di *Micrococcus casei liquefaciens* in base al loro potere fondente sulla gelatina. Ora io non ho potuto accedere a tale proposta, avendo dimostrato che non tutti i cocchi acido-presamigeni rivelano il loro potere proteolitico nelle culture in gelatina; per cui se per la loro ricerca e sistematica ci si attenesse a tale criterio ed alla conseguente denominazione di *liquefaciens*, si finirebbe a trascurarne un gruppo non indifferente, che pur meritano di essere messi fra i caseolitici, per il solo fatto che non fondono la gelatina di

(1) Gorini, Rend. R. Acc. Lincei, XXI, 2° sem., 1912, pag. 472.

(2) Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett. XL, 1907, pag. 947.

(3) Gorini, Rend. R. Acc. Lincei, 1910, 2° sem., pag. 150.

cultura. Ond'è che io mi trovai indotto ad assegnare invece a detti cocchi il nome più adatto di *Micrococcus casei acidoproteolyticus*.

Da tutte queste premesse concludo che per la classificazione dei fermenti lattici sia consigliabile di attenersi piuttosto alle proprietà fisicochimiche che alle morfologiche, e di basarsi sul loro comportamento in latte studiato colla massima accuratezza e sul maggior numero possibile di culture in trapianti successivi periodici.

Ed ora senza nessun intendimento di proporre delle classificazioni nè di creare nuovi nomi, credo opportuno di esporre i criteri secondo i quali io tengo ripartiti i fermenti lattici della mia collezione, per regolarmi nei trapianti che vado facendo periodicamente da oltre 12 anni in latte sterilizzato (in autoclave a 120° C. per 20 minuti).

1. Un primo criterio sta nel potere gasificante, separando nettamente i fermenti lattici specifici da quei fermenti lattici gasogeni che entrano piuttosto nei gruppi del *Bacterium Coli* e del *Bacterium lactis aerogenes*.

2. Un secondo criterio sta nel potere caseolitico, distinguendo i fermenti che nelle culture non ridisciolgono il coagulo latteo, da quelli che lo ridisciolgono, sempre s'intende mantenendo reazione acida. In questa distinzione però procedo molto cautamente, imperocchè vi sono fermenti lattici che mostrano subito fin dall'inizio delle culture il loro potere caseolitico, altri invece che lo rivelano solamente in progresso di tempo. Talora il ritardo dipende dalla temperatura a cui è stata fatta la cultura. In generale, come già dimostrai anni addietro (¹), la temperatura elevata è più favorevole all'attacco del lattosio che a quello della caseina, onde nelle culture tenute a simili temperature la dissoluzione del coagulo tarda a manifestarsi; all'incontro nelle culture tenute al di sotto di 30° C. la caseolisi si compie contemporaneamente alla saccarolisi. Notevole è l'aspetto offerto talvolta dal coagulo in queste condizioni. Bisogna sapere che il coagulo in via di peptonificazione assume colore giallognolo mentre il coagulo inattaccato ha colore biancastro; orbene, si danno delle culture di questi fermenti lattici proteolitici che presentano un coagulo bicolore, cioè giallognolo nella zona superiore, biancastro nella zona inferiore, alla quale la digestione si estende solamente in seguito; nelle culture di altri fermenti invece la peptonificazione avviene di botto in tutto il coagulo con separazione di siero per lo più laterale; in altri termini, nei primi la peptonificazione si mostra più strettamente legata all'accesso dell'aria che nei secondi. Ma vi sono però dei fermenti lattici i quali, a qualunque temperatura siano messi a coagulare, non accennano a ridisciogliere il coagulo se non tardivamente; e questa dissoluzione avviene

(¹) Gorini, *Bullettino Ufficiale del Ministero di Agricoltura*, 1897 e *Annales de Micrographie*, 1897, IX, pag. 433.

preferibilmente a temperatura bassa. Così per esempio vi sono dei fermenti lattici proteolitici, i quali a 35° C. danno un coagulo sodo, che se rimane a quella temperatura si conserva compatto e a poco a poco essicca per evaporazione, comportandosi come i coaguli dati dai fermenti lattici non proteolitici; ma se invece il coagulo viene portato per tempo alla temperatura ambiente, va lentamente sgretolandosi e disciogliendosi gradatamente in siero giallo citrino. Curiosa è la formazione di caverne, di anfrattuosità, di fimbrie, di lacinie che compaiono in seno ai coaguli di questi fermenti lattici che chiamerò *tardivamente proteolitici* in confronto agli altri *precocemente proteolitici*.

3. Un terzo criterio di differenziazione dei fermenti lattici lo tratto dalla temperatura *optimum* di incubazione; a questo riguardo ho trovato di poter stabilire tre gruppi di fermenti, a seconda che prediligono temperature attorno ai 25° C., ai 37° C. e ai 45° C. Ve ne sono poi alcuni che sono atti a svilupparsi a tutte le temperature, dall'ambiente fino ai 45° C., altri invece che sono legati ad una scala termometrica piuttosto ristretta, ad es. fra 25 e 37° C., oppure fra 30 e 45° C., persino soltanto fra 30 e 37° C.; ricordo infine i fermenti lattici termofili come il *Bacillus lactis thermophilus* da me descritto nel 1894 ⁽¹⁾ che ha una temperatura di sviluppo fra 37° e 65° C., e i fermenti lattici psicrofili che prosperano anche a temperature inferiori ai 10° C., come i cocchi acidopresamigeni del formaggio da me descritti ⁽²⁾.

4. Un quarto criterio lo derivò dalla rapidità di coagulazione, facendo astrazione, ben s'intende, dalle variazioni di vigoria vegetativa che sono inerenti all'età delle culture da cui si fanno i trapianti. Qui trovo comodo per i miei trapianti di fare tre gruppi di fermenti lattici; quelli che coagulano in giornata, cioè nello spazio di dieci o dodici ore, quelli che coagulano da un giorno all'altro, cioè nello spazio di 24 ore, e quelli che impiegano più giorni a coagulare, ritardando persino 15-20 giorni. E questa lentezza di coagulazione non accenna a scemare stabilmente per quanto avvicinati siano gli innesti successivi.

5. Un quinto elemento di cui tengo calcolo nel raggruppamento dei fermenti lattici della mia collezione è la durata della loro vitalità; la quale mi serve di norma per la frequenza dei trapianti. Mentre alcuni si possono trapiantare a distanza di mesi, altri resistono malamente al di là di un mese, altri infine esigono di essere rinfrescati ogni settimana o al massimo ogni quindici giorni, purchè si abbia cura però di aumentare in tal caso la quantità di semente. Infatti, mentre nella generalità dei casi, per i trapianti da provetta a provetta (contenenti circa 10 cc. di latte) mi valgo, come di consueto, di un'ansa di semente; per alcuni fermenti ho riconosciuto la ne-

⁽¹⁾ Gorini, Giornale della R. Società Italiana d'Igiene, XVI, 1894.

⁽²⁾ Gorini, Rend. R. Acc. Lincei, XX, 2° sem., 1911.

cessità di adoperarne almeno tre anse; imperocchè quando usavo anche per questi una sola ansa, mi accadeva che una parte dei trapianti non riusciva a coagulare, ancorchè facessi trapianti molto avvicinati. Ciò sta a dinotare una ben scarsa vitalità di questi fermenti almeno nelle culture artificiali in latte sterilizzato; onde si spiega come molti di essi finiscano coll'andar perduti nelle collezioni e possano passare anche inosservati.

6. Qui tornano in acconcio alcune osservazioni relative al potere acidificante dei fermenti lattici. A tutta prima parrebbe presumibile che detto potere sia proporzionale alla loro rapidità di coagulazione sul latte. Ma in realtà non è sempre così. Certamente quel gruppo sunnominato di batteri che coagulano il latte in giornata, cioè nello spazio di 10-12 ore, posseggono un alto potenziale acidificatore, il quale può spingersi fino oltre 50 gradi Soxhlet (cioè 50 c.c. di soluzione quartnormale di soda per 50 cc di cultura in latte); ma fra i batteri che coagulano solamente in capo a parecchi giorni di incubazione ve ne ha che producono un grado di acidità più elevato di altri fermenti i quali coagulano bensì in tempo più breve, cioè in 24-48 ore, ma con acidificazione piuttosto debole; sono questi ultimi i fermenti lattici che segregano anche un enzima presamico, per cui la coagulazione del latte avviene per l'azione associata dell'enzima coll'acidità, ancora prima che questa abbia raggiunto un grado sufficiente per determinare la precipitazione della caseina.

7. L'argomento dell'enzima presamico mi induce ad esporre un altro ordine di osservazioni.

Come già ebbi a dire in precedenti lavori, la guida che mi ha condotto a scoprire la formazione di enzima presamico presso alcuni batteri acidificanti del latte, fu la constatazione della loro facoltà caseolitica; ciò in base alla cognizione che la digestione della caseina è generalmente preceduta da una trasformazione della stessa operata da un enzima presamico. Laonde, ogniquale volta ho incontrato un fermento lattico proteolitico mi sono curato di verificare se fosse anche presamigeno. Debbo dire che tale accertamento mi riuscì facile nella maggior parte dei casi; in alcuni casi però mi è fallito per qualche tempo e mi fu possibile assodarlo solamente in seguito a ripetute prove, variando l'età della cultura e la temperatura di incubazione.

A dilucidazione di ciò, ricorderò che il metodo da me adottato per la ricerca dell'enzima presamico consiste nel filtrare la cultura attraverso candela Chamberland e nell'aggiungere porzioni di filtrato, variabili da $\frac{1}{2}$ a 2 cc., a provette di 10 cc. di latte sterilizzato che vien posto a 35°-37 C. unitamente ad altre provette del medesimo latte per controllo. Io mi attengo a questo metodo perchè lo giudico il più sicuramente al riparo dagli errori che possono verificarsi quando si facciano i saggi con culture non filtrate o su latte non sterilizzato. Riconosco peraltro che il mio metodo non è il più sensibile, cioè non è il più adatto a rivelare la presenza di deboli quantità

di enzima; imperocchè in primo luogo una parte dell'enzima può, com'è noto, rimanere trattenuto nella parete della candela filtrante; in secondo luogo il latte sterilizzato a temperatura elevata perde assai, come pure si sa, della sua attitudine a coagulare per opera del presame. Aggiungasi che sperimentando sul filtrato noi eliminiamo dalla reazione i corpi batterici e conseguentemente la parte endocellulare dell'enzima (endoenzima). A questo riguardo merita di essere segnalato il caso occorsomi di fermenti lattici che, mentre si dimostravano attivamente proteolitici, non mi hanno rivelato la proprietà presamigena se non quando dopo replicati tentativi mi indussi ad assaggiarne culture molto invecchiate, nelle quali verosimilmente era avvenuto un disfacimento cellulare con passaggio degli endoenzimi nel liquido di peptonificazione.

Pertanto, sebbene riterrei arrischiato ammettere in linea assoluta l'associazione costante delle attività presamigene colle attività caseolitiche dei fermenti lattici, credo bene però di asserire che io finora l'ho sempre osservata e che le poche volte in cui mi è sorto qualche dubbio, mi è riuscito di dissiparlo insistendo opportunamente nelle ricerche.

Del resto, ripeto, l'argomento merita di essere studiato caso per caso, anche come contributo alla *vexata quaestio* della unicità o duplicità degli enzimi coagulante e proteolitico, contributo che io ho già intrapreso a recare in un lavoro precedente⁽¹⁾.

8. A questo tema si riannoda l'altro non meno importante della qualità dei prodotti di caseolisi.

Sottoponendo il siero ottenuto per filtrazione delle culture di fermenti lattici proteolitici alla ricerca dei diversi derivati azotati, mediante i successivi trattamenti con acido acetico, tannico, fosfovolfamico, e con barite, è facile accertare che la demolizione della caseina non si arresta ai peptoni e alle albumosi, ma scende anche più in basso fino agli amino-acidi e all'ammoniaca. Debbo dire però di aver osservato che il processo di degradazione della caseina varia a seconda della temperatura a cui i fermenti sono tenuti, e segnatamente a seconda del grado di acidificazione raggiunto. Questa differenza è rilevabile anche semplicemente dall'aspetto e dal sapore del siero di solubilizzazione. Lo stesso batterio quando è coltivato a temperature basse, con conseguente inacidimento debole e lento, espelle un siero torbido, gialliccio, e amarognolo, mentre se è coltivato a temperature elevate, con conseguente inacidimento più rapido e intenso, esprime un siero limpido, pressochè incolore o appena leggermente citrino e di sapore acidulo punto disgustoso. Degna di nota in quest'ordine d'idee è anche la dimostrazione da me data di un fermento lattico filante la cui cultura in latte perde la vischiosità coll'aumentare dell'inacidimento⁽²⁾.

(¹) Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett., XLI, 1908, pag. 117.

(²) Gorini, Rend. R. Acc. Lincei, XXI, 1912, 2^o sem.

Pertanto anche lo studio dei prodotti di demolizione della caseina per parte dei fermenti lattico-proteolitici deve essere condotto con cura su numerose culture, variando la temperatura di incubazione e tenendo nota del grado di acidificazione.

Come si vede, parecchi sono i caratteri fisio-chimici sotto i quali i fermenti lattici meritano di essere differenziati, in base ad uno studio approfondito del loro comportamento in latte senza bisogno di ricorrere a criteri estranei, che offrono il pericolo di misconoscere le strette affinità di alcuni tipi di fermenti lattici o di assimilare specie distinte di detti fermenti.

Chimica. — *Una nuova ossima della santonina* ⁽¹⁾. Nota di GUIDO CUSMANO, presentata dal Socio A. RÖTTI.

Per la santonina, chetone asimmetrico, erano prevedibili due ossime stereoisomeriche; invece, sin ad oggi si conosceva solamente quella preparata da S. Canizzaro ⁽²⁾ nel 1885. È ben vero che I. Klein ⁽³⁾ ne descrisse un'altra con p. f. 202°, ma P. Gucci ⁽⁴⁾ dimostrò trattarsi dell'antica ossima impura. Come risulterà dalla presente Nota, si è ora riusciti a ottenere la seconda ossima della santonina.

In precedenti ricerche ⁽⁵⁾ si è posto in rilievo che molte isonitrammine dei terpeni, riscaldate verso 100° con alcali, perdono acido iponitroso, trasformandosi in corpi con un doppio legame unito al carbonio che portava il gruppo isonitramminico. La reazione avviene celeremente e in soluzioni diluite, cosicchè si rendono improbabili ulteriori azioni degli alcali sulle tanto instabili molecole terpeniche. Si è supposto che lo stesso potesse accadere per le due isonitramminossime α e β descritte tempo fa per la santonina ⁽⁶⁾, e che, quindi, da esse si sarebbe passati a due ossime. Difatti, riscaldando quelle sostanze con la quantità equimolecolare di idrato sodico normale, si sviluppa protossido d'azoto, e dal composto β si forma l'ossima di Canizzaro, e da quello α una nuova ossima. Esse si distinguono per questi caratteri:

Ossima di Canizzaro. — Fonde a 216°-218°, meno solubile nell'acqua e nell'alcool dell'altra; cristallizza con una mol. d'acqua; si scioglie negli

⁽¹⁾ Lavoro eseguito nel Laboratorio di Chimica generale dell'Ist. di Studi superiori in Firenze.

⁽²⁾ Ber. deut. Ch. Gesell., 18, 2746.

⁽³⁾ loc. cit., 26, 412.

⁽⁴⁾ Comunicaz. scientif. R. Acc. Fisioeritici di Siena, giugno 1897.

⁽⁵⁾ R. Acc. Lincei, XIX, 5^a, 1° sem., pag 747 (1910); Gazz. ch. ital., XLII, I.

⁽⁶⁾ Francesconi e Cusmano, Gazz. ch. it., 39, II (1909).