

ATTI
DELLA
REALE ACCADEMIA DEI LINCEI

ANNO CCCXII.

1915

SERIE QUINTA

RENDICONTI

Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali.

VOLUME XXIV.

2° SEMESTRE.



ROMA

TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI

PROPRIETÀ DEL DOTT. PIO BEFANI

1915

tali valori r_i , il wronskiano delle funzioni

$$H(sr_i) + \frac{1}{\sqrt{\gamma}} H_1(sr_i) \quad (i = 1, 2, \dots, p_1)$$

e quello delle

$$H(sr_i) - \frac{1}{\sqrt{\gamma}} H_1(sr_i) \quad (i = 1, 2, \dots, p_2)$$

siano diversi da zero.

Nel caso, poi, che $K(st)$ ammetta uno solo dei due valori $\pm \frac{1}{\sqrt{\gamma}}$, come autovalore, una delle due funzioni (8) e (9) dovrà esser nulla, qualunque sia la $\chi(t)$; e quindi tale anche una delle (8') e (9'), per ogni valore di r ; dovrà cioè sussistere una delle due seguenti uguaglianze:

$$H(st) \pm \frac{1}{\sqrt{\gamma}} H_1(st) = 0,$$

la quale ci fornirà un secondo criterio (ved. § 3) per riconoscere quale dei due valori $\pm \frac{1}{\sqrt{\gamma}}$ la $K(st)$ ammetta come autovalore.

Microbiologia. — *Ulteriori ricerche sull'attività proteolitica dei fermenti lattici. I. L'influenza della temperatura* (1). Nota del prof. COSTANTINO GORINI, presentata dal Socio G. BRIOSI (2).

Nel 1897 (3) ho dimostrato come la scomposizione del lattosio e della caseina per opera di uno stesso batterio stia in rapporto colle condizioni di temperatura, nel senso che la peptonificazione della caseina si compie preferibilmente a bassa temperatura (mentre la scomposizione del lattosio si compie preferibilmente ad alta temperatura): la medesima osservazione ho ripetuto in successivi lavori (4) descrivendo vari tipi di batteri acidoproteditici che isolai dalle mammelle vacche e dal formaggio; in un più recente studio (5) sulla differenziazione dei fermenti lattici ho fatto risaltare

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Batteriologia della R. Scuola superiore di Agricoltura di Milano.

(2) Pervenuta all'Accademia il 21 settembre 1915.

(3) Gorini C., Boll. Uff. del Minist. Agricoltura, Roma 1897; *Annales de Micrographie*, Paris 1897, IX, pag. 438.

(4) Gorini C., Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett., 1907, XL, pag. 47; Rend. R. Acc. Lincei, 1910, pag. 150 e 1911, pag. 284.

(5) Gorini C., Rend. R. Acc. Lincei, 1912, pag. 790.

la particolarità di certe specie che solamente a bassa temperatura rivelano il loro potere caseolitico, onde misi in guardia contro il possibile errore di ritenere non proteolitici certi fermenti lattici in causa dell'elevata temperatura a cui sono coltivati (¹). Siffatto errore è tanto più facile quando si tratta di germi dotati di una scala termometrica di sviluppo ristretta, che pigramente vegetano alla temperatura bassa più confacente per la proteolisi. Ho indicato però come si possa anche in simili casi accertare l'azione peptonizzante dei fermenti lattici, pur che si abbia cura di promuoverne dapprima lo sviluppo alla temperatura *optimum* e di portarli poi per tempo alla temperatura bassa voluta, facendo entrare in giuoco gli endo- ed ecto-enzimi proteolitici elaborati dai batteri durante il florido sviluppo iniziale.

Richiamai inoltre l'attenzione sulla diversità delle qualità organolettiche che presenta il siero di peptonificazione dato da un medesimo fermento lattico a seconda della temperatura di sviluppo; diversità di caratteri organolettici che lascia presumere differenze nei prodotti di caseolisi.

Volendo controllare con dati analitici siffatte constatazioni, ho pensato che, di fronte alle difficoltà e incertezze tuttora esistenti nella identificazione dei singoli derivati di degradazione proteica, potesse bastare, a titolo di saggio, la determinazione comparativa dell'azoto solubile che è precipitato dall'acido tannico, dal solfato ammonico e dall'acido fosfotungsticico (²). Ho voluto vedere cioè se prendendo culture in latte rigorosamente parallele di un medesimo batterio, tenute a diverse temperature, e sottoponendole ai suddetti trattamenti, si ottenessero differenze di risultato sufficienti per farsi un'idea circa l'influenza della temperatura sull'attività peptonizzante di quel batterio.

Ho scelto come soggetti due specie di fermenti lattici appartenenti al gruppo dei miei batteri acidopresamigeni che a siffatta influenza termica si palesavano soggetti anche giudicando semplicemente all'aspetto ed al sapore del siero di solubilizzazione.

Queste due specie diversificano fra loro nelle culture in latte per i seguenti caratteri, in conformità ai criteri da me stabiliti per la differenziazione dei fermenti lattici (³).

(¹) A conferma delle mie ricerche, Chr. Barthel di Stoccolma ha riferito ultimamente, al sesto Congresso internazionale di lattaria di Berna 1914, di fermenti lattici del tipo *Streptococcus* che gli si rivelarono capaci di peptonificare la caseina pur che fossero coltivati a temperature basse fra 15 e 20° C.

(²) Senza entrare nel dibattito tuttora vivo fra gli Autori, ricorderò solamente che dalla maggioranza si ritiene: *a*) che l'acido tannico precipiti tanto le albumosi quanto i peptoni, di cui però alcuni sarebbero solubili in eccesso; *b*) che il solfato ammonico precipiti le albumosi e non i peptoni; *c*) che l'acido fosfotungsticico precipiti i peptoni e fors'anco gli aminoacidi. Ora poi si è trovato che alcuni di questi precipitati proteici sono ridisciolti parzialmente nel lavaggio (Van Slyke, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, vol. V, pag. 1617).

(³) Gorini C., Rend. R. Acc. Lincei, 1912, XXI, pag. 790.

La specie A ha forma bacillare; presenta una scala termometrica di sviluppo assai ampia, prosperando pressochè ugualmente bene fra 25° e 35° C.; coagula il latte in 24 ore con un potenziale acidificatore abbastanza alto che può toccare il 9 per mille in acido lattico; appartiene ai fermenti lattici che ho chiamato *precocemente proteolitici*.

La specie B ha forma coccica o cocco-batterica; presenta una scala termometrica di sviluppo ristretta, con un *optimum* circoscritto attorno ai 35° C.; coagula il latte in due tre giorni con un potere acidificatore debole che a stento raggiunge il 5 per mille in acido lattico; appartiene ai fermenti lattici che ho designato *tardivamente proteolitici*.

Per le ricerche, di cui è parola, ho coltivato questi batteri in beute Erlenmeyer da 300 centimetri cubici contenenti ciascuna 250 cm³ di latte sterilizzato in autoclave per 20 minuti a 120° C. Trattandosi di indagini comparative assai delicate, ho curato che il latte fosse della medesima qualità e appartenesse alla medesima seduta di sterilizzazione; ciò in omaggio alle mie precedenti osservazioni sull'influenza che divarii anche minimi e inafferrabili sia nelle qualità originarie, sia nella sterilizzazione del latte, possono esercitare nel comportamento delle culture.

Le seminagioni venivano fatte con quantità uguali (1 cm³) di una medesima cultura ben sviluppata in latte di ciascun batterio, e le culture venivano messe per un dato tempo a temperature diverse, agitandole quotidianamente fino al giorno dei saggi chimici.

In tale giorno si facevano anzitutto debiti trapianti in latte e in agarlattosato per accertare che il batterio era ancora in vita e ancora allo stato di purezza (Queste verifiche risultarono sempre positive). Indi la cultura, che era stata pesata all'inizio, veniva riportata con acqua stillata al peso originario, a compensazione delle perdite dovute ad evaporazione durante l'incubazione, la quale talora si protrasse fino a 45 giorni.

Poiché la cultura veniva filtrata attraverso carta e sul siero filtrato si procedeva alle varie determinazioni.

A tal uopo il siero veniva diviso in porzioni da 10 cm³ ciascuna, che servivano per le seguenti operazioni:

1) Determinazione dell'acidità con soluzione decinormale di soda (indicatore fenoltaleina). (Questa determinazione era consigliabile, ben conoscendo che anche l'acidità per sè sola può influire sulla proteolisi).

2) Trattamento con acido nitrico per vedere se il siero filtrato contenesse ancora albuminoidi non solubilizzati (Ciò non si verificò mai, o solamente in minime tracce).

3) Trattamento con acido tannico a freddo, fino ad avere eccesso di precipitante.

4) Trattamento con solfato ammonico a saturazione a freddo.

5) Trattamento con reattivo Scheibler all'acido fosfovolframico a freddo fino ad eccesso di precipitante (Il reattivo Scheibler si compone, come è noto, di acido fosfovolframico gr. 0,30, alcool a 96°, gr. 20, acqua stillata gr. 180, acido cloridrico gr. 1).

I precipitati che si ottenevano nei singoli trattamenti, venivano raccolti su filtri Berzelius tarati e poi pesati previa essiccazione a 100° C. fino a costanza di peso.

Quanto al precipitato del solfato ammonico, non essendo esso suscettibile di lavaggio, veniva dosato il solfato d'ammonio contenuto e, per differenza, si otteneva il peso del precipitato proteico.

I saggi eseguiti sono ripartibili in quattro gruppi: due col fermento A e due col fermento B. I risultati ottenuti sono consegnati nella sottostante tabella, ove i valori dei singoli precipitati, che chiamo *valori di proteolisi*, rappresentano le percentuali in rapporto al siero filtrato. L'acidità vi è espressa in acido lattico. Le temperature di cultura poste a raffronto sono tre: termostato a 35° C., termostato a 25° C., e temperatura ambiente fra 15° e 20° C.

In ciascuna finca delle temperature è indicato il tempo durante il quale la cultura stette alla temperatura corrispondente.

GRUPPO	CULTURA	BATTERIO	TEMPERATURA DELLA CULTURA			ACIDITÀ (‰ acido lattico)	VALORI DI PROTEOLISI PRECIPITATI CON:		
			35° C.	25° C.	15°-20° C.		Acido tannico	Acido fosfotung- stico	Solfato ammonico
I	1	A	1 giorno		4 giorni	4.85	0.44	2.81	1.16
	2	"		5 giorni		5.94	0.57	2.40	0.88
	3	"	5 giorni			5.94	0.65	1.07	0.25
II	4	"		45 giorni		9.00	2.07	5.05	1.23
	5	"	45 giorni			8.55	2.46	2.32	0.72
III	6	B		19 giorni		2.29	1.43	1.14	0.94
	7	"	2 giorni	17 giorni		2.74	1.77	2.83	1.68
	8	"	19 giorni			2.96	1.22	1.31	1.20
IV	9	"	2 giorni		24 giorni	2.70	1.94	3.77	1.97
	10	"		26 giorni		3.69	1.645	1.78	1.03
	11	"	26 giorni			4.86	2.42	1.79	1.42

Da uno sguardo d'assieme alla tabella emerge che differenze nei valori di proteolisi (che per brevità designerò con VP) se ne sono avute, e differenze anche abbastanza apprezzabili, a seconda della temperatura di sviluppo.

All'incontro non si nota nessun legame fra i VP e i gradi di acidità (che per brevità designerò con GA); vero è che ai più alti GA segnati nella tabella (ved. gruppo II) corrispondono anche i più alti VP, ma ciò è in relazione col più progredito sviluppo delle culture 4 e 5 che sono durate 45 giorni, per cui si ebbe naturalmente un più profondo attacco, come della caseina (peptonizzazione), così del lattosio (acidificazione). Ma se paragoniamo le culture parallele degli altri gruppi, scorgiamo talora anzi un rapporto inverso fra acidificazione e peptonificazione, che è quanto dire un rapporto diretto fra acidificazione e temperatura di sviluppo, lo che viene a rafforzare la mia antica osservazione sul vantaggio che l'attacco microbico del lattosio, oppostamente a quanto accade per l'attacco della caseina, risente dalle temperature elevate. Il fatto poi che fra le culture 4 e 5 la più acidificata è quella tenuta a temperatura più bassa (a 25° invece che a 35° C.), si spiega quando si faccia distinzione fra rapidità e intensità di attacco del lattosio, per cui a temperatura alta la cultura si inacidisce più precocemente ma, col progredire dell'età, essa raggiunge un massimo di acidificazione superiore a bassa che ad alta temperatura; col medesimo meccanismo si capisce come le culture 2 e 3 sebbene tenute a diversa temperatura abbiano, in capo a cinque giorni, raggiunto pari grado di acidità.

Passando ora ad esaminare nel loro complesso le tre finche dei VP, osserviamo alcune discordanze specialmente fra i precipitati tannici e gli altri due precipitati; talora il primo è in aumento, mentre i secondi sono in diminuzione (v. ad es. il gruppo I), e viceversa (v. ad es. il gruppo III). Invece i due precipitati dati dall'acido fosfovolframico e dal solfato ammonico presentano fra loro una concordanza costante, se non sempre proporzionata, negli aumenti e nelle diminuzioni. Le discrepanze della reazione tannica parmi trovino fondamento nell'indeterminatezza degli Autori circa il potere precipitante dell'acido tannico sui derivati azotati solubili, alcuni dei quali verrebbero anzi ridisciolti in eccesso di reattivo. Del resto tanto queste disparità nella reazione tannica, quanto la deficienza di proporzionalità fra le reazioni del solfato ammonico e dell'acido fosfotungstico, possono interpretarsi altresì come indizi di quella sopraenunciata diversità *qualitativa*, oltrechè quantitativa, di prodotti proteolitici che un medesimo batterio potrebbe dare a seconda della temperatura, in accordo con la diversità di caratteri organolettici che ho notato nel siero di peptonificazione a seconda della temperatura della cultura.

Comunque sia di ciò, appagandomi per ora di valutare la quantità complessiva dei prodotti proteolitici, ritengo miglior consiglio di porre in seconda linea i valori dei precipitati tannici e di assumere come guida i valori cumulativi delle altre due reazioni. Analizziamo adunque partitamente i risultati dei singoli gruppi per vedere se e come essi depongano in appoggio

delle mie constatazioni precedenti, se e come cioè l'azione caseolitica sia favorita dalla bassa temperatura.

Nel gruppo I abbiamo tre culture del bacillo A (a scala termica ampia) tenute a temperature diverse per cinque giorni; si nota un valore di peptonificazione sensibilmente maggiore nella cultura 2 tenuta a 25° C., che nella cultura 3 tenuta a 35° C. pur avendo raggiunto pari grado di acidità; maggiore ancora poi è il valore di peptonificazione nella cultura 1, che venne tenuta a 35° C. per 1 giorno, affine di accelerarne lo sviluppo iniziale, e poi alla temperatura ambiente per 4 giorni, sebbene abbia raggiunto un grado di acidità inferiore.

Nel gruppo II abbiamo due culture del medesimo fermento A tenute a diversa temperatura per un mese e mezzo, raggiungendo un GA molto più elevato delle culture del gruppo I, ma differenti fra loro, per le ragioni sovraesposte. Anche qui la cultura 4 tenuta a 25° C. è assai più peptonificata della cultura 5 tenuta a 35° C.

Nel gruppo III abbiamo tre culture del fermento B (a scala termica ristretta) tenute per ugual tempo a diverse temperature, raggiungendo un grado di acidità diverso. Qui ci troviamo davanti a fatti parzialmente contraddittori. Se badiamo all'acidità, confrontando la cultura 6 colle culture 7 e 8, scorgiamo un rapporto diretto fra il VP e il GA; infatti la 6 con acidità di 2.29 ha minor VP delle 7 ed 8 con GA maggiore; ma confrontando invece le culture 7 ed 8 fra loro, il rapporto diventa inverso, poichè quest'ultima con acidità di 2.96 presenta un VP decisamente più basso della 7 che ha un'acidità di soli 2.74. Se badiamo invece alla temperatura di sviluppo, ravvisiamo nelle culture 6 e 8 un risultato opposto a quello osservato nel fermento A; la cultura 8 tenuta a 35° C. presenta un VP maggiore della cultura 6 tenuta per ugual tempo a 25° C.; all'incontro nelle culture 7 ed 8 abbiamo un fatto analogo a quello dell'A. Come si spiegano questi divari contraddittori? Basta riflettere che il fermento B ha una scala termica di sviluppo più ristretta; mentre l'A si sviluppa ugualmente bene tanto a 35° C. quanto a 25° C., il B si sviluppa più lentamente a 25° C. che a 35° C., onde questo ritardo nella moltiplicazione cellulare si esplica così in un GA minore, come in un VP minore. Ma se, come nel caso 6, si ha cura di promuovere inizialmente la moltiplicazione cellulare tenendo la cultura dapprima per un paio di giorni alla temperatura eugenetica di 35° C., allora, sebbene venga poi messa a 25° C., essa, pur restando arretrata nel processo di acidificazione in confronto alla cultura conservata sempre a 35° C., rivela un processo di peptonificazione più intenso non solamente della consorella tenuta per ugual tempo sempre a 25° C., ma anche di quella tenuta per ugual tempo sempre a 35° C.

Ancora più convincente appare siffatto comportamento nelle tre culture del gruppo IV, appartenenti al medesimo fermento B, che furono tenute per

ugual tempo una a 35° C., una seconda a 25° C. e la terza in parte a 35° C. e in parte a 15-20° C. Fra le culture 10 e 11, raggiunse un VP alquanto maggiore la 11 con una temperatura di sviluppo e un GA superiori; ma entrambe furono superate di parecchio nel VP dalla cultura 9, sebbene questa sia stata tenuta, almeno per la maggior parte del tempo, a temperatura molto inferiore ed abbia raggiunto un GA notevolmente minore delle consorelle.

RIASSUNTO E DEDUZIONI. — Riassumendo adunque le presenti ricerche recano un nuovo contributo analitico alla dimostrazione da me già data da tempo (1897) circa l'*influenza favorevole che le basse temperature esercitano sull'attività proteolitica dei fermenti del latte*. Da esse inoltre scaturiscono varie deduzioni interessanti per lo studio sulla biologia dei fermenti lattici.

In primo luogo ne deriva che *l'attività caseolitica dei fermenti lattici va studiata, in modo particolare, nelle culture tenute a bassa temperatura*. Ciò è consigliabile anche qualora a questa temperatura lo sviluppo della cultura fosse inceppato, imperocchè in tal caso basta ricorrere all'*espedito* di tenerla dapprima, solo per breve tempo, alla temperatura *optimum* per lo sviluppo iniziale, e portarla poi alla temperatura bassa, opportuna per la proteolisi.

In secondo luogo le mie ricerche vengono ad *allargare sempre più la schiera dei miei fermenti lattico-proteolitici capaci di peptonizzare la caseina in ambiente acido*. Infatti esse permettono di presumere che molte specie di fermenti lattici che gli Autori dichiararono sprovviste o quasi di potere caseolitico, tali apparissero loro unicamente perchè erano state studiate soltanto in culture tenute a temperature elevate, le quali saranno state propizie bensì per lo sviluppo del germe e per l'attacco del lattosio, ma non erano confacenti all'attacco della caseina. Tutto ciò viene a provare lucidamente che *la temperatura optimum non è la medesima per tutte le funzioni di un dato microbio*.

In terzo luogo torna acconcio ribadire in questa occasione l'ammonimento che ho già dato altre volte ⁽¹⁾, *essere insostenibile il nesso*, ammesso dagli Autori, *fra la forma e l'attività fisiologica dei fermenti lattici*. Qui noi abbiamo constatato, infatti, che il medesimo comportamento nei riguardi dell'attività proteolitica rispetto alla temperatura, si è manifestato tanto presso un fermento lattico di forma bacillare (A), quanto presso un fermento lattico di forma coccica (B). Molte differenze di attività fisiologica che sono state ravvisate fra certi bacilli e certi cocci lattici devono verisimilmente essere legate piuttosto a questioni di razze o varietà di una stessa specie, che non a questioni di forma.

(1) Gorini C., Rend. R. Acc. Lincei, 1912, XXI, pag. 472.

Da ultimo i valori di proteolisi indicati nella tabella, a seconda dei reattivi usati, mostrano la possibilità di verificare pure per via analitica una *differenza non soltanto quantitativa, ma anche qualitativa nei prodotti proteolitici* dati dai fermenti lattici a norma della temperatura; ciò in appoggio a quanto io ho pure messo in luce circa la diversità nei caratteri organolettici del siero di peptonificazione che è dato da un medesimo fermento lattico a seconda della temperatura di sviluppo (¹).

Volendo ora darsi ragione della maggiore attività caseolitica a temperatura bassa, deve aver peso la considerazione che a questa temperatura i fermenti lattici attaccano più lentamente il lattosio, onde il latte raggiunge più tardivamente, che a temperatura alta, un grado di acidità capace di attenuare e arrestare lo sviluppo dei batteri, i quali possono così continuare più a lungo l'attacco della caseina. Questa spiegazione però non è sufficiente, almeno non per tutti i casi, imperocchè il fenomeno della maggiore attività caseolitica a temperatura bassa si verifica anche quando si abbia cura di aggiungere al latte del carbonato di calce, in guisa da neutralizzare gradatamente la formantesi acidità. Ritornerò su questo punto in altra occasione.

(¹) Gorini C., Rend. R. Acc. Lincei, 1912, XXI, pag. 790.

E. M.
