

Ricerche sui fermenti lattici (Nota III)

Dott. I. Politi (Vice Direttore)

(Ricevuto il 21 ottobre 1941-XIX)

OSSERVAZIONI SUL POTERE PROTEOLITICO DEI FERMENTI LATTICI NEI CONFRONTI DELL'ANDAMENTO DEI PROCESSI DI ACIDIFICAZIONE DEL LATTE E DEI CARATTERI FISICI DEL COAGULO PRESAMICO

Nel piano delle ricerche iniziate da questa Stazione sul complesso problema delle proprietà casearie del latte, in rapporto alle influenze che talune condizioni, e specialmente il tipo di alimentazione del bestiame, esplicano sulle proprietà medesime, è parso utile effettuare dapprima alcune indagini preliminari, aventi per oggetto alcune caratteristiche fisiologiche dei fermenti lattici. L'importanza fondamentale dell'intervento di cotesti microrganismi nei processi caseari sta infatti ad indicare, dati i fini che si perseguono, quanto sia utile possedere conoscenze sufficientemente precise e complete intorno alle reciproche correlazioni ed influenze che esistono o che si stabiliscono fra la mutevole composizione del latte e gli agenti, enzimatici e microbici, che presiedono alle sue trasformazioni. E' anzi nostra convinzione che solo in virtù di adeguate conoscenze sui caratteri fisiologici e culturali dei fermenti lattici sarà possibile dare un indirizzo razionale e sistematico allo studio delle proprietà e delle attitudini casearie del latte; inoltre è evidente che le indagini così condotte potranno recare un efficace contributo anche per fini più propriamente tecnologici.

Le osservazioni di cui si è riferito nella nota precedente. (Questi Annali 1930 I pag. 213) hanno posto in luce che a condizionare lo sviluppo dei vari fermenti lattici nel latte intervengono principalmente le seguenti caratteristiche fisiologiche, diverse da specie a specie ed anche da ceppo a ceppo: potere fermentativo per il lattosio, capacità di utilizzazione dei composti proteici del latte, esigenze di speciali fattori di accrescimento o stimolanti. Degna di particolare attenzione è, fra queste caratteristiche, la differente capacità di utilizzare le proteine del latte, in quanto la maggior parte dei costituenti azotati di questo è appunto data da proteine complesse allo stato colloidale, la cui assimilazione da parte dei microrganismi non può aver luogo se non attraverso un processo d'idrolisi. Alle proprietà proteolitiche dei fermenti lattici va quindi attribuita una grande importanza, sia perchè da esse dipende la rapidità dello sviluppo e l'intensità dell'acidificazione prodotta dai germi stessi, sia perchè le proprietà medesime interessano direttamente la caseina e le sue trasformazioni nei prodotti caseari. Difatti, l'intensa partecipazione dei fermenti lattici ai processi di maturazione dei formaggi è, si può dire, da tutti accettata, anche se le nostre conoscenze al riguardo sono piuttosto sommarie ed incomplete.

Muovendo da queste considerazioni si sono compiute le ricerche di cui segue l'esposizione; alcune di esse concernono l'influenza dell'azione proteolitica del caglio sui processi di acidificazione lattica ed altre l'influenza dello sviluppo di vari fermenti lattici sui caratteri fisici del coagulo pre-samico.

I. - INFLUENZA DEL PRESAME SUI PROCESSI DI ACIDIFICAZIONE DEL LATTE.

Queste ricerche consistettero essenzialmente nel controllo dell'acidificazione subita dal latte addizionato, oltre che di fermenti lattici, di una piccola quantità di presame (in proporzioni non molto discoste da quelle che si impiegano in pratica per la preparazione dei formaggi).

Si è operato con del latte crudo, istituendo anche una duplice prova di acidificazione, con aggiunta o non di caglio ma senza addizione di microrganismi. La tecnica seguita fu la seguente:

Si sono centrifugati cc. 20 di coltura microbica ben sviluppata in siero-peptone; il sedimento venne poi sospeso in 10 cc. di acqua sterile; 2 cc. della sospensione microbica così ottenuta vennero addizionati a 100 cc. di latte, previamente portato a 30°, e quindi agitato; si prelevarono sterilmente 30 cc., distribuendoli in 4 provette sterili, ed al rimanente si addizionò cc. 0.7 di soluzione di caglio in polvere (titolo 1:150.000) al 5 %; dopo nuova agitazione, si distribuì in provette, ponendo queste e le precedenti a 30° in bagno di Ostwald. Si determinò quindi il grado di acidità (pH) del latte dopo ore 2,45', 6,45', 23 e 48.

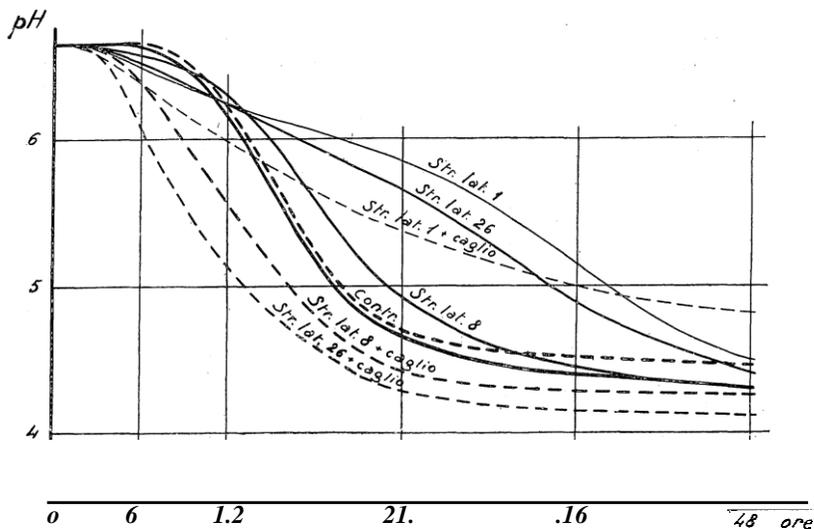
Per questa indagine furono impiegati gli stessi streptococchi lattici esaminati con le ricerche esposte nella nota precedente; i risultati ottenuti sono raccolti nella tab. I ed in parte riprodotti dal diagr. I.

Tab. I - INFLUENZA DEL CAGLIO SULL'ANDAMENTO DELLA ACIDIFICAZIONE DEL LATTE - pH iniziale del latte = 6,65.

Cultura microbica aggiunta	pH dopo ore							
	2,45'		6,45'		23		48	
	latte	latte + caglio	latte	latte + caglio	latte	latte + caglio	latte	latte + caglio
	6,65	6,67	6,62	6,65	4,7	4,7	4,32	4,45
Str. latt. ceppo 1	6,6	6,57	6,45	6,33	5,9	5,4	4,48	4,8
» 8	6,6	6,6	6,55	6,3	5	4,45	4,3	4,25
» 12	6,63	6,62	6,53	6,35	5,7	5,5	4,4	4,75
» 14	6,6	6,57	6,5	6,28	5,25	4,53	4,35	4,32
» 17	6,6	6,61	6,48	6,35	5,65	5,4	4,35	4,7
» 26	6,6	6,58	6,5	5,95	5,7	4,32	4,38	4,1

Ponendo ora a confronto gli andamenti dell'acidificazione subita rispettivamente dal latte e dal latte sottoposto contemporaneamente all'azione del caglio, è agevole rilevare che, ad eccezione della prova senza aggiunta di microrganismi, l'influenza del caglio si è manifestata in modo ben evidente accelerando ed intensificando il processo di acidificazione. Perciò, anche se l'effetto non è stato sentito nella stessa misura dai singoli ceppi, il che è senz'altro da attribuirsi alle diverse caratteristiche fisiologiche di questi, appare logico dedurre che il caglio esplica un'azione favorevole sullo sviluppo degli streptococchi lattici in genere; con ogni probabilità in virtù del noto potere proteolitico da esso posseduto e per il quale si ha formazione di proteosi, di peptoni e forse anche di piccole quantità di aminoacidi. Questa interpretazione è del resto in accordo con i risultati delle precedenti ricerche, le quali hanno dimostrato che la piuttosto lenta e limitata acidificazione prodotta da alcuni streptococchi lattici deve essere attribuita essenzialmente ad assai scarsa attività proteolitica, per cui i microrganismi medesimi risultano particolarmente sensibili alla presenza di piccole quantità di composti azotati più facilmente assimilabili delle proteine del latte.

Considerando ora il decorso dell'acidificazione spontanea subita dal latte, senza e con aggiunta di caglio, non è dato rilevare che lievi differenze fra le due prove. Ciò dipende, con ogni probabilità, dal fatto che l'acidificazione è stata qui determinata da una flora microbica mista, comprendente fermenti lattici ed anche altri germi che hanno svolto, almeno in un primo tempo, una non lieve attività proteolitica.



Diagr. I. - Influenza del caglio sull'andamento dell'acidificazione del latte prodotta da alcuni Streptococchi lattici.

Alla stessa spiegazione conducono pure i risultati di alcune prove di acidificazione spontanea, compiute con latti addizionati di peptone Witte (nelle proporzioni di 0,05 %, 0,25 %, 2 %), le quali non hanno dato luogo che

a lievi differenze rispetto alle prove di controllo con latte non addizionato di peptone.

L'esame dei risultati ottenuti dà modo di compiere altri interessanti rilievi nei riguardi dell'influenza che l'aggiunta delle colture microbiche ha esplicato sul decorso dell'acidificazione del latte; emergono così le seguenti constatazioni:

— l'aggiunta degli streptococchi è stata seguita da un aumento dell'acidità, mentre nella prova di acidificazione spontanea, senza addizione di microrganismi, il pH ebbe a diminuire in misura apprezzabile soltanto dopo 6 ore; ciò è chiaro, data la quantità dei germi aggiunti in confronto a quelli inizialmente contenuti nel latte;

— trascorse le prime 6-10 ore, l'acidificazione è proceduta con intensità nettamente maggiore nel latte semplice che non in quello addizionato di streptococchi. L'addizione medesima, se si esclude la prima fase dell'acidificazione, ha agito quindi come un ostacolo rispetto al rapido inacidimento determinato dalla microflora già contenuta nel latte.

L'interessante fenomeno può essere agevolmente spiegato se si tengono presenti le assai ridotte attitudini degli streptococchi impiegati, e specialmente di alcuni di essi, ad utilizzare le proteine del latte: infatti, per la loro superiorità numerica, i germi aggiunti hanno fortemente paralizzato la microflora preesistente nel latte e perciò l'acidificazione è proseguita per loro azione pressochè esclusiva e, dopo l'esaurimento dei composti azotati di pronta assimilazione, con una rapidità che è stata in funzione delle loro attitudini, più o meno ridotte, ad utilizzare le proteine complesse.

Nella fermentazione spontanea del latte si ebbe invece lo sviluppo di microrganismi diversi, ivi sicuramente compresi anche germi che, dotati di intensa attività proteolitica, hanno creato nel substrato condizioni più favorevoli per il successivo intenso sviluppo dei microrganismi acidificanti.

Non sono naturalmente da escludere eventuali azioni simbiotiche, ma nel suo complesso il fenomeno appare dominato dalle predette caratteristiche fisiologiche; e sotto questo aspetto le attività svolte dai germi proteolitici ed acidoproteolitici, nella fase iniziale dei processi di inacidimento spontaneo del latte, appaiono di non trascurabile importanza quali cause favorevoli al rapido decorso dell'inacidimento medesimo.

D'altra parte è agevole comprendere come i fermenti dotati di più ridotta capacità proteolitica, possano svolgere, se presenti in numero sufficientemente elevato, un'utile funzione nella conservazione del latte; sia ostacolando lo sviluppo dei microrganismi putrefacenti, sia rallentando lo stesso inacidimento spontaneo.

II. - INFLUENZA DEI FERMENTI LATTICI SUI CARATTERI FISICI DEL COAGULO PRESAMICO.

È risaputo che il processo di coagulazione presamica del latte è fortemente influenzato da molte condizioni, quali la temperatura, il grado di acidità ecc., nonchè da caratteri propri, e più o meno incostanti, del latte stesso; caratteri che a loro volta sono dipendenti dall'età degli animali, dal regime alimentare ecc. Si sa pure che l'influenza medesima si manifesta

sia sull'attività del presame (velocità della coagulazione), sia sui caratteri fisici del coagulo.

È evidente a priori che una grande importanza compete in questo senso alle azioni microbiche, in quanto alle medesime è dovuto l'acidimento del latte; nulla di preciso si può affermare invece circa influenze di altra natura e perciò con le ricerche di cui segue l'esposizione si è voluto indagare in merito a quelle eventualmente connesse allo sviluppo di alcuni fermenti lattici.

Poichè ad espressione sintetica dei caratteri fisici di un coagulo può essere assunta la resistenza che il coagulo stesso offre alla rottura, è parso utile impiegare per le ricerche medesime il dispositivo dinamometrico descritto su questi Annali (Vol. I Fasc. IV pag. 210) e derivato dall'analogo di Hill.

Date le finalità delle esperienze, si è seguita una tecnica diversa da quella indicata da Hill per distinguere i latti che danno un coagulo molle, da quelli a coagulo resistente. Anzi, dovendosi eliminare l'influenza del mutevole comportamento del latte, si sono compiute diverse serie di determinazioni, in modo da impiegare un unico latte per ciascuna di queste.

Il latte, senza alcun trattamento (1), oppure trattato nei modi che saranno indicati, e previamente portato alla temperatura d'esperienza, venne introdotto nella quantità di 250 cc. in bicchiere a forma alta della capacità di 600 cc.; dopo aver mantenuto in bagno termostatico sino al raggiungimento della temperatura di questo, si aggiunse 1 cc. di soluzione al 0,5% di caglio in polvere (titolo 1:150.00); si agitò e si applicò uno dei coltelli di cui è corredato l'apparecchio; si lasciò coagulare e dopo il tempo richiesto dall'esperienza si procedette alla misura della resistenza del coagulo, operando con movimento lento e continuo.

Vennero compiute alcune determinazioni preliminari allo scopo di controllare l'influenza che alcune condizioni fisico-chimiche (temperatura, acidità, aggiunta di CaCl_2) esplicano sulla resistenza del coagulo; ciò soprattutto allo scopo di stabilire le condizioni sperimentali più adatte per le successive prove con microrganismi. I risultati ottenuti sono riassunti nei prospetti seguenti.

INFLUENZA DELLA TEMPERATURA

Tempi	T = 37° Resistenza del coagulo	Tempi	T = 30° Resistenza del coagulo
30'	36	40'	23
45'	43	55'	34
60'	55	70'	40
75'	84	85'	54

(1) Trattandosi di prove di controllo al latte venne addizionata dell' H_2O distillata in quantità pari al liquido aggiunto nelle altre prove dell'esperienza.

INFLUENZA DEL GRADO DI ACIDITÀ (pH) - TEMPERATURA 37°

Tempi	pH = 6.6	pH = 6.45	pH = 6.3	pH = 6.03
30'	36	60	78	100
45'	43	69	89	104
60'	55	89	105	115
75'	84	94	104	112

INFLUENZA DEI SALI DI CALCIO - TEMPERATURA 37°

Tempi	latte	latte	latte
		CaCl ₂ M /500	CaCl ₂ M/250
30'	58	61	72
45'	63	70	86
60'	70	93	100
75'	71	89	85

Sulla base di codesti risultati, che tra l'altro dimostrarono l'idoneità del procedimento seguito a determinare l'influenza che i vari fattori esplicano sui caratteri fisici del coagulo, vennero stabilite le modalità sperimentali secondo cui procedere all'accertamento dell'influenza esplicita dallo sviluppo dei fermenti lattici. La tecnica prescelta fu la seguente:

Si sottoposero a centrifugazione cc. 30 di coltura microbica di 20-22 ore in siero-peptone; il sedimento venne quindi sospeso in 5 cc. di acqua distillata sterile e addizionato a cc. 400 di latte, previamente introdotti in Erlenmeyer. Si pose in termostato e, controllando in tempi successivi il pH, si attese il raggiungimento di un conveniente grado di acidificazione; dopo di che si prelevarono e si introdussero nell'adatto bicchiere i 250 cc. necessari per la determinazione della resistenza del coagulo presamico; il latte rimasto venne a sua volta introdotto in altro bicchiere più piccolo che assieme al precedente venne immerso in bagno termostatico regolato a $37^{\circ} \pm 0,1$. Dopo aver atteso che il latte si portasse a temperatura costante di 37° , si procedette all'aggiunta del presame e contemporanea misura del pH sul latte del bicchiere piccolo; dopo 30' si determinò la resistenza del coagulo e, nuovamente, il pH raggiunto.

Con lo stesso latte vennero saggiati diversi stipiti di fermenti lattici ed effettuate altresì cinque prove senza semina di microrganismi ma con semplice aggiunta di acido lattico in quantità crescenti e tali da abbracciare il campo delle variazioni di acidità prodotte dai fermenti impiegati. I risultati delle determinazioni sono raccolti nella Tab. II.

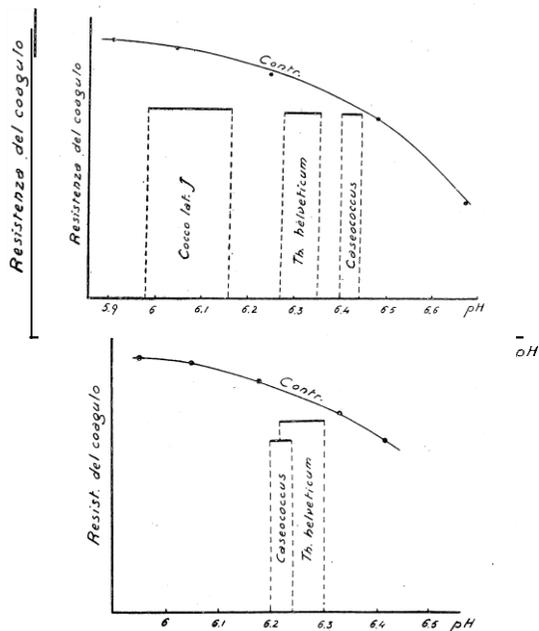
Dall'esame di essi emerge chiaramente che il coagulo ottenuto con latte acidificato per azione degli streptococchi e del *Lact. bulgaricus* ha presentato,

Tab. II - INFLUENZA DELLO SVILUPPO DI ALCUNI FERMENTI LATTICI SULLA RESISTENZA DEL COAGULO PRESAMICO.

Serie	Al latte si è aggiunto:	pH	Resistenza del coagulo
I	--	6.73	39
	ac. lattico	6.37	80
	» »	6.22	92
	» »	6.08	106
	» »	5.98	107
	Strep. latt. ceppo 1	6.1-6.02	103
	» » » 8	6.05-6.-	107
	» » » 12	6.15-6.1	102
	» » » 14	6.1-6.05	104
	» » » 17	6.18-6.15	101
	Lact. bulgaricus	6.38-6.3	84
	II	ac. lattico	6.42
» »		6.33	86
» »		6.18	98
» »		6.05	105
» »		5.95	107
Th. helveticum		6.3-6.22	83
Caseococcus Gorini (Acido proteolitico)		6.24-6.2	76
III	--	6.67	51
	ac. lattico	6.47	87
	» »	6.24	106
	» »	6.04	117
	» »	5.9	120
	Th. helveticum	6.35-6.27	89
	Caseococcus Gorini (Acido proteolitico)	6.44-6.4	90
	Cocco lattico J.	6.16-5.98	91

rispetto al coagulo prodotto con latte acidificato allo stesso grado mediante acido lattico, differenze trascurabili e comprese largamente entro i limiti di approssimazione del metodo. Differenze ben più accentuate, e che non appaiono imputabili ad errori strumentali, si osservano invece nei confronti del *Thermobacterium helveticum*, del Cocco lattico J. e del *Caseococcus* (acidoproteolitico), il cui sviluppo appare pertanto influente sui caratteri fisici del

coagulo presamico, indipendentemente dalla acidificazione prodotta dai germi stessi nel latte (Diagr. II e III). Poichè si sa con certezza che il *Thermobacterium helveticum* e più ancora il Caseococco sono dotati di proprietà caseinolitiche ben più intense di quelle degli streptococchi lattici e del *Lact. bulgaricus*, si può dedurre che la constatata influenza è da attribuirsi, con ogni probabilità, alle suddette proprietà caseinolitiche. Se ora si tiene presente che il grado di acidificazione raggiunto dal latte nelle esperienze sopra descritte non è molto discosto da quello che si raggiunge in alcune lavorazioni casearie, l'azione esplicata dai tre predetti fermenti lattici appare considerevole anche dal punto di vista tecnologico; e ciò sia che la si consideri



Diagr. II e III - Influenza di alcuni fermenti lattici sulla resistenza del coagulo presamico.

nei confronti diretti delle caratteristiche fisiche del coagulo, sia anche dal punto di vista dell'intensità della stessa azione caseinolitica. Del pari è giustificato presumere che in una lavorazione casearia, anche a prescindere dal grado di acidità del latte sottoposto a coagulazione, il coagulo possa presentare caratteri fisici diversi a seconda della natura dei germi che, presenti naturalmente oppure aggiunti per mezzo di colture, si sono sviluppati ed

hanno presieduto all'acidimento del latte stesso. E poichè, come s'è visto, i caratteri fisici del coagulo risultano modificati in misura diversa a seconda del potere caseinolitico dei germi, è logico pensare che dal punto di vista considerato una non trascurabile importanza può verosimilmente competere anche ai tipici batteri proteolitici che, com'è noto, figurano sempre fra i componenti della flora microbica del latte; nonchè a tutto quel complesso di condizioni alle quali sono comunque legati e l'intensità dello sviluppo microbico e il vario prevalere dei diversi microorganismi.

Ovvie ragioni prudenziali non consentono per ora di attribuire alle considerazioni precedenti un valore definitivo; a conclusioni più complete si potrà tuttavia pervenire proseguendo le ricerche sulla base dei risultati ottenuti e secondo l'indirizzo che da essi emerge.

RIASSUNTO

Dalle ricerche compiute sono emersi i seguenti rilievi:

Il presame aggiunto al latte esplica una favorevole influenza sullo sviluppo degli Streptococchi lattici in genere, dei quali accelera ed intensifica l'attività fermentativa; molto probabilmente l'influenza medesima è dovuta alla nota azione proteolitica, per la quale si ha formazione di composti azotati più facilmente utilizzabili delle proteine del latte.

In seguito all'aggiunta di colture di streptococchi lattici dotati di assai ridotta azione proteolitica si ha che, nonostante l'immediato inizio dell'acidificazione, questa, dopo alcune ore, procede con intensità nettamente minore di quella che subirebbe lo stesso latte lasciato acidire spontaneamente.

I fermenti lattici dotati di più scarsa azione sulla caseina non modificano in modo apprezzabile la resistenza del coagulo presamico se non per il solo effetto dell'acidità da essi prodotta. Per contro fermenti che, come il *Thermobacterium helveticum* ed i cocchi acidoproteolitici, siano dotati di un potere caseinolitico più intenso di quello degli Streptococchi lattici, modificano i caratteri fisici del coagulo anche indipendentemente dalla loro attività acidificante.

Si richiama l'attenzione sull'importanza che potrebbe competere ai tipici microrganismi proteolitici, non solo per le trasformazioni da essi determinate, nei costituenti del latte, ma anche per l'influenza delle loro attività sullo sviluppo della microflora acidificante.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus den angestellten Untersuchungen ergibt sich folgendes:

Das der Milch zugesetzte Lab übt einen günstigen Einfluss auf die Milchstreptokokken aus, indem es deren Gärungstätigkeit beschleunigt und verstärkt. Höchst wahrscheinlich ist dieser Einfluss der bekannten proteolytischen Tätigkeit zu verdanken, die zur Bildung von leichter verwendbaren stickstoffhaltigen Komplexen der Milchproteine führt. Wenn der Milch Streptokokkenkulturen mit sehr reduzierter proteolytischer Tätigkeit zugefügt

Werden, beobachtet man dass trotz des unmittelbaren Beginnes der Ansäuerung, dieselbe nach wenigen Stunden mit einer viel niedrigeren Intensität fortschreitet als bei der spontan angesäuerten Milch der Fall ist.

Milchfermente die Kasein wenig beeinflussen, verändern die Resistenz des Labgerinnsels nicht merklich, abgesehen von der Wirkung der erzeugten Säure. Im Gegensatz, Fermente die - wie der *Thermobacterium helveticum* und die proteolytische säurebildenden Kokken - eine stärkere Wirkung auf Kasein ausüben als die Milchstreptokokken, ändern die physikalischen Eigenschaften des Gerinnsels, auch unabhängig von ihrem Ansäuerungsvermögen.

Es wird die Bedeutung hervorgehoben welche die echten proteolytischen Mikroben, nicht nur in Bezug auf die von ihnen ausgelosten Umwandlungen der Milchbestandteile, sondern auch auf den Einfluss ihrer Tätigkeiten für die Entwicklung der säurebildenden Keime, besitzen können.