

# Le fermentazioni dell'*Acetobacter Xylinum* e la sintesi della cellulosa

G. A. BROSSA

(Ricevuto il 2 marzo 1942-XX)

In questi ultimi anni si è molto parlato di una sintesi batterica della cellulosa a partire dal glucosio. Si tratta della continuazione di vecchie esperienze di A. Brown e di G. Bertrand, recentemente riprese in modo più esauriente da G. Schmidt, H. Hibbert, J. Barsha e Y. Khouvine. Essi trovarono che, coltivando *l'Acetobacter xylinum* su terreni inorganici addizionati a fruttosio, glucosio, galattosio, ecc. si ottengono membrane spesse e tenaci di cellulosa. Tale sintesi dovuta all'*A. xylinum* si ha, secondo Y. Khouvine, anche partendo da alcoli a 4, 5, 6, 7, 8 atomi di carbonio, come pure dalla glicerina, ottenendo, dopo una ventina di giorni, fino al 20 % di cellulosa (dalla mannite). L'*A. xylinum* possiede quindi la facoltà di ossidare gli alcoli nei rispettivi aldosi e chetosi e di polimerizzarli.

Noi abbiamo ripreso con intenti pratici ricerche e studi su queste fermentazioni, che desideriamo rendere noti, facendoli precedere da alcune notizie sulla biochimica dell'*A. xylinum* e di altri batteri acetificanti del gruppo.

La parola fermentazione, nel senso comunemente impiegato, risveglia il concetto di sdoppiamento e di scomposizione. Così parlando di fermentazione alcoolica, si pensa senz'altro allo sdoppiamento dello zucchero in alcool e anidride carbonica e si dimentica che in pari tempi i lieviti producono sinteticamente le sostanze necessarie alla formazione del loro organismo, composto di materiali assai più complessi dello zucchero da cui hanno origine.

I due fenomeni di costruzione e di distruzione decorrono paralleli, e non sempre questi ultimi sono i più importanti. Gli uni e gli altri sono strettamente legati a condizioni di ambiente, quali l'ossigenazione, la nutrizione e la temperatura.

Ad esempio nei lieviti durante la vita anaerobica predominano i fenomeni di scomposizione (formazione di alcool), mentre il contrario avviene nella vita aerobica, in cui prevalgono i prodotti di sintesi nella quale la massima parte degli idrati di carbonio servono alla riproduzione. La sintesi del glicogeno nei lieviti è parimenti legata a condizioni di ambiente e si ha una massima produzione di glicogeno, quando abbondano nel substrato gli idrati di carbonio, mentre, quando questi scarseggiano, il glicogeno scompare.

Se le nostre conoscenze sui fenomeni di decomposizione delle sostanze che prendono parte al ricambio batterico presentano ancora parziali oscurità e numerose lacune, anche più oscure e limitate sono le nostre cono-

scenze sui processi di sintesi, che si verificano nel metabolismo microbico. Oltre la formazione di grassi dagli idrati di carbonio, dimostrata sia negli organismi superiori che nei microrganismi, e oltre la sintesi di sostanze proteiche che avviene ad es. nel metabolismo dei lieviti di varie specie, la condensazione di zuccheri semplici a disaccaridi e a polisaccaridi, fino alla produzione di cellulosa, amidi, glicogeno, gomme e mucilagini, ecc. è certo uno dei processi più diffusi e più interessanti del ricambio microbico.

Vediamo dapprima in quali rapporti morfologici e genetici questi composti sintetici del metabolismo batterico, stiano col batterio che li ha prodotti.

Come è noto, il corpo degli Schizomiceti o Batteri, è unicellulare e consta, come le cellule vegetali in genere, di un protoplasma e di una parete cellulare. Il protoplasma, che è la parte viva della cellula, si suole dividere in una parte interna o endoplasma, ed una parte esterna od ectoplasma. Tra le due non esiste alcuna netta separazione, ma l'ectoplasma è più denso, più rinfangente ed è quello che dà origine alla parete o membrana cellulare, che a noi interessa in modo particolare. La presenza della membrana cellulare è dimostrabile con la colorazione e con la plasmolisi. La porzione esterna di tale membrana, in alcuni schizomiceti (*B. capsulatus*, *B. Pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae*, ecc.) dà luogo alla formazione di una sostanza omogenea, difficilmente colorabile, che prende il nome di capsula. In altri casi essa si rigonfia assumendo l'aspetto di una massa gelatinosa. Tale gelatinificazione della membrana è talora molto evidente ed allora la cellula batterica o le catenelle da essa formate, appaiono avvolte in una massa voluminosa che prende il nome di *zooglea*: queste forme sono frequenti e caratteristiche dei batteri acetificanti e vanno sotto il nome volgare di *madre dell'aceto*.

Desfosses <sup>1)</sup>, in epoca ormai remota della microbiologia, aveva osservato nel succo di bietola o di canna da zucchero la formazione di masse lobate, verrucose della grandezza di una nocciola, di consistenza mucogelatinosa che talora trasformavano in masse semigelatinose tutto il liquido zuccherino. Egli chiamò fermentazione viscosa tale trasformazione. Pasteur attribuì una origine microbica a questa *gomma di zuccherificio* e la sua ipotesi fu in seguito confermata da vari ricercatori, che constatarono la presenza di uno speciale germe, *l'Ascococcus mesenteroides (Leuconostoc)* <sup>2)</sup>.

Formazioni mucilaginose furono spesso osservate in preparazioni farmaceutiche, prodotti industriali, latte, pane ed altri generi alimentari.

Queste ed altre osservazioni hanno dimostrato che tali fermentazioni sono dovute all'azione delle più svariate specie batteriche.

Secondo Benecke <sup>3)</sup> sarebbe errato il credere che la presenza o l'assenza degli involucri mucosi o gelatinosi costituisca un carattere differenziale e specifico di un dato schizomicete. Infatti alcuni batteri purpurei (*Chromatium*, *Rhodotheca* e altri) talvolta hanno vivaci movimenti, tal'altra invece sono immobili e circondati da membrane gelatinose. Alcune specie patogene formano la capsula solo nell'organismo e non la formano nei terreni di coltura (*B. capsulatus*). Lo stesso *Leuconostoc mesenteroides*,

che è caratterizzato dal suo voluminoso rivestimento gelatinoso, può crescere affatto privo di tale rivestimento.

Sarebbe qui fuori proposito un'arida enumerazione delle ipertrofie della membrana cellulare riscontrate nei vari microrganismi, enumerazione che chiunque potrà trovare in opere speciali sull'argomento <sup>4)</sup>.

Si possono formulare molte ipotesi sul significato di questi involucri mucogelatinosi. In alcuni casi queste membrane, per il loro peso specifico, possono permettere agli schizomiceti avidi di ossigeno di galleggiare alla superficie dei liquidi, come è il caso dei batteri acetificanti. Talora invece pare che esse servano loro di protezione dagli improvvisi cambiamenti di temperatura (*Leuconostoc e batteri del latte*) e dalle cause di rapido essiccamento e simili.

Le difficoltà di preparazione delle membrane batteriche e delle produzioni che ne dipendono, hanno dato luogo a lunghe controversie sulla loro costituzione chimica, costituzione anche oggi, tranne poche eccezioni, non del tutto chiarita. È certo tuttavia che bisogna rinunciare a considerare l'antica concezione che la membrana microbica sia sempre costituita dalla stessa cellulosa delle piante superiori. Mulder già aveva studiato la *madre dell'aceto* e Nägeli e Loew, trattandola con idrato sodico e acido cloridrico, separarono una sostanza solubile in reattivo cuproammoniacale, sostanza che idrolizzata dava luogo a zucchero. Nencki e Schaffer parlarono di una cellulosa delle sarcine e dei batteri della putrefazione.

La questione della natura cellulosa della membrana batterica è stata nuovamente ripresa in seguito agli studi di A. Brown sull'*A. xylinum*. Il Brown riteneva che la membrana dell'*A. xylinum* fosse formata da cellulosa mentre il Beijerinck la considerava costituita da sostanze amilacee e l'Emmerling da chitina. Quest'ultima ipotesi era basata sulla presunta insolubilità in reattivo cuproammoniacale, sul contenuto in azoto e sulla presenza di glucosamina fra i suoi prodotti di degradazione. Vedremo in seguito che gli studi recenti hanno invece confermato l'ipotesi di Brown.

Anche a proposito di altri schizomiceti, dei batteri della difterite e della tubercolosi (Aronson, Iwanoff), del batterio del fieno (Vandervelde), del *B. prodigiosus* (Nishimura) si hanno infinite discussioni se le membrane siano formate da chitina, da cellulosa, da emicellulosa e da pectine.

Noi ci limiteremo a parlare solo delle fermentazioni mucilaginose, poichè esse stanno in rapporto diretto con le sintesi che formano oggetto del presente lavoro. Anche per quanto riguarda i particolari di tali fermentazioni rimandiamo alla lettura di opere speciali e non tratteremo qui, che in modo possibilmente breve, della produzione di alcune sostanze gommose, osservate frequentemente, per opera di schizomiceti e di eumiceti. Tali sostanze gommose riceverono da Beijerinck <sup>5)</sup> il nome di glucosano, levulano, mannano, galattano, arabano, ecc. secondo che i loro prodotti di idrolisi danno origine a destroso, fruttosio, mannosio, galattosio, ecc.

Queste sostanze viscoso e gommose, che si trovano nel terreno di coltura, sono dovute, come abbiamo visto, alla formazione di involucri muciluginosi, che dalla cellula batterica passano nel substrato. Esse vengono dai batteriologi denominate gomme, benchè non rassomiglino dal punto di vista strutturale alle comuni gomme vegetali.

I componenti più frequenti di tali gomme sono il fruttosano o levulano, prodotto da microorganismi del tipo *Bacillus mesentericus* e *B. subtilis* e da altre specie similari.

Il levulano studiato esaurientemente da Hibbert e Tarr<sup>6</sup>) è un polimero del 2,6 anidro-fruttosano di tipo furanico, analogo alla inulina del carciofo (1,2 anidro-fruttosano).

Vi è un rapporto ben determinato fra il substrato ed il polisaccaride sintetizzato dal microorganismo. Ad esempio il *B. mesentericus* non agisce nè sul glucosio, nè sul galattosio, nè sul mannosio e neanche sul fruttosio normale (frutto-piranosio), ma solamente sul saccarosio dal quale si origina il fruttosio del tipo richiesto per tale sintesi batterica (frutto-furanosio). Esso agisce anche su altri polisaccaridi che contengono il frutto furanosio, ad esempio sul raffinoso. Altre specie affini quali il *B. vulgatus* ed il *B. megatherium* e la *Pseudomonas pruni* danno luogo alla formazione di levulano.

Varie specie del *Leuconostoc* producono glucano, che non fu studiato finora in modo esauriente, causa la resistenza presentata alla metilazione. Pare che anche in questo caso intercedano stretti rapporti fra la configurazione molecolare del substrato ed il polisaccaride. Tale sintesi avviene dal destroso del saccarosio, mentre il levuloso rimane invariato. Altri polisaccaridi, quali l'arabano e il galattano, non ben studiati finora, sono dovuti al metabolismo di schizomiceti poco noti, in parte fitopatogeni (*Bact. sacchari*, *Bact. acaciae*, ecc.).

Tralasciando per ora di parlare delle polimerizzazioni dovute all'*A. xylinum* che formeranno oggetto della nostra trattazione, accenneremo ad altri polisaccaridi di tipo più complesso, ma meno studiati, quali sono quelli prodotti dai batteri delle leguminose (varie specie di *Rhizobium*). Questi polisaccaridi sembrano avere una composizione affine alle comuni gomme vegetali e contengono acidi uronici. Essi non hanno alcun rapporto con gli zuccheri del substrato, al contrario di quanto avveniva nei casi precedenti, ma possono dare luogo a prodotti sintetici, partendo da qualsiasi idrato di carbonio. Pare che questa attività sintetica sia in rapporto alla fissazione dell'azoto e che alcune razze di *Rhizobium* siano più attive delle altre. Finora all'analisi in questi prodotti di sintesi non furono riscontrati che il glucosio e l'acido glucuronico.

Anche i funghi formano spesso polisaccaridi che per idrolisi danno galattosio, mannosio, glucosio, idosio e altroso. Ad es. la *Fumago vagans* e altri funghi formano polisaccaridi dal glucosio. Il *Penicillium luteum* produce uno speciale acido luteico, che idrolizzato dà acido malonico e glucosio. Il *Penicillium Charlesii* coltivato su glucosio dà luogo ad acidi e polisaccaridi: un polimannosio ed un poligalattosio (mannocaroloso), il quale, studiato in questi ultimi anni, risulta essere formato da una catena di 8-9 mannosio. Il *Penicillium varians* sintetizza un polisaccaride complesso (varianosio), che per idrolisi dà galattosio, glucosio ed un altro esosio, formando catene di varie unità coi due mannosio.

Nel micelio dei funghi sono frequenti sostanze che furono considerate equivalenti a sostanze tipiche delle piante che furono denominate cellulosa di funghi, amido di funghi, ecc. La micologia è generalmente materia riservata ai botanici e quindi la trattazione chimica è sovente manche-

vole, per questo motivo le accennate analogie coi prodotti di sintesi delle piante sono spesso dovute a somiglianze superficiali, basate su colorazioni istologiche od a reazioni colorate, senza che l'identità sia stata ulteriormente stabilita. Non basta ad es. che un polisaccaride dia luogo ad una colorazione azzurra con iodio, perchè senz'altro saggio debba essere considerata come amido.

La parte solubile in acqua di taluni miceli, idrolizzata con acidi diluiti e fermenti dà origine a zuccheri, generalmente glucoso. Dal *Penicillium expansum* si ottiene il polisaccaride detto mixodestrano e dall'*Aspergillus niger* un mixogalattano. Con lo stesso *Aspergillus niger* si ottiene il così detto amido solubile, che pare essere un amilose.

I tessuti dei funghi trattati con alcali diluiti sono in parte solubili ed in parte insolubili. L'estratto solubile contiene idrati di carbonio, finora non ben definiti, mentre la parte insolubile consiste nella cosiddetta cellulosa di funghi o micocellulosa considerata da alcuni come cellulosa vera infiltrata da altre sostanze, e da alcuni come cellulosa modificata. Tale cellulosa è stata caratterizzata in base a reazioni colorate e raramente in seguito a preparazioni di derivati.

Norman <sup>7)</sup> parlando del derivato acetilico dice che quantunque la cellulosa dai funghi sia parzialmente acetilabile, il prodotto ottenuto non è solubile in cloroformio, come dovrebbe avvenire per la acetilcellulosa normale. Un'altra differenza è data dal fatto che la cellulosa dai funghi è completamente insolubile in soluzione cuproammoniacale. Essa è peraltro solubile in acido solforico 72 % a freddo, come pure è solubile quando essa venga trattata con solfuro di carbonio e idrato sodico. Anche la chitina contenuta nei tessuti dei funghi è diversa dalla chitina animale.

Negli ultimi decenni specialmente per opera dei ricercatori dell'Istituto Rockefeller la batteriologia ha ricevuto un nuovo impulso dalle ricerche chimiche sui polisaccaridi dei microrganismi e tali studi hanno validamente contribuito a chiarire alcune questioni ancora oscure nel campo delle immunità e della patogenesi delle infezioni. I microrganismi più studiati da questo punto di vista furono i pneumococchi: negli ultimi anni però le ricerche si estesero ad altri cocchi, a batteri e a funghi <sup>8)</sup>.

In base a dati immunitari i pneumococchi furono distinti in 32 tipi. A ciascun tipo di pneumococco corrisponde un polisaccaride specifico, isolato dalle sue colture, che rappresenta un glucide o un suo derivato costituente la capsula del germe. A questo polisaccaride sarebbe da riferirsi la tipospecificità immunitaria del gruppo. Specialmente ben studiati furono i polisaccaridi del tipo I, II, III, IV. Essi hanno il peso molecolare molto elevato (1000-5000) e differiscono dal punto di vista immunitario, essendo attivi per sieri omologhi e inattivi per gli altri. Da ceppi di questi tre gruppi furono isolati composti di diverso potere rotatorio, che originano prodotti di idrolisi differenti: I, con il 5 % di azoto, è formato da acido galatturonico e aminoglucoso, mentre II e III sono privi di azoto e sono formati rispettivamente da glucoso e da glucoso e acido aldobionico.

Questi idrati di carbonio, anche in grandissime diluizioni (1 : 5.000.000), danno una precipitazione specifica coi sieri omologhi, ma non hanno funzione di antigene. Questa si ottiene copulando il polisaccaride con una pro-

teina, ad es. con siero di cavallo: si forma così un antigene sintetico, che iniettato nel coniglio dà un immunosiero specifico, eminentemente attivo per il polisaccaride da cui deriva.

Anche nei bacilli della tubercolosi furono riscontrati polisaccaridi dai quali si ottennero d-arabinoso, d-mannoso e d-galattoso <sup>9)</sup>. Prima di lasciare questo argomento, vogliamo ancora brevemente accennare alla sintesi data dai microrganismi di polisaccaridi assai importanti, quali il glicogeno e l'amido.

Cremer <sup>10)</sup> trovò che l'estratto di lievito lasciato a riposo qualche tempo perdeva il suo glicogeno e che questo si produceva nuovamente se al succo veniva aggiunta una sufficiente quantità di zucchero. Henneberg <sup>11)</sup> confermò questa osservazione su lieviti viventi e trovò che l'aggiunta del 20 % di saccarosio permetteva ai lieviti di accumulare grandi quantità di glicogeno. D'altra parte si era osservato che la quantità di anidride carbonica sviluppata dai lieviti era minore di quella equivalente all'idrato di carbonio scomparso e ciò perchè una parte dello zucchero si trasformava in polisaccaridi affini o identici al glicogeno. Il glicogeno viene consumato dai lieviti quando nei substrati non siano presenti altri idrati di carbonio. Molti autori hanno constatato che simili prodotti di condensazione dei monosi, che danno una colorazione rosso-bruna con iodio, sono formati dalle cellule di vari microrganismi in alcuni periodi della loro evoluzione.

In molti microrganismi, *Aspergilli*, *Penicilli*, ecc., fu osservata la presenza di sostanze simili all'amido che danno la caratteristica reazione con iodio. Boas constatò che in presenza di glucoso o di altri esosi o anche pentosi, l'*Aspergillus niger* produce sostanze simili all'amido e che questa sintesi è favorita da speciali condizioni sperimentali. Grey stabilì che il *Bacterium coli commune* nel suo metabolismo, in presenza di eccesso di idrati di carbonio forma delle sostanze amilacee.

\*\*\*

La natura provvede in modo sobrio ed elegante alla formazione ed alla degradazione degli idrati di carbonio: le piante verdi sintetizzano in presenza della luce gli idrati di carbonio dall'anidride carbonica dell'atmosfera, i lieviti fermentano gli idrati di carbonio in alcool ed i batteri acetificanti ossidano l'alcool in acido acetico e successivamente in anidride carbonica.

La presenza di bacilli acetificanti in natura e la loro facile adattabilità sono causa di frequenti infezioni dei liquidi zuccherini e danno luogo alla acidificazione della birra, dei mosti e del vino.

Già nel 1822 Persoon aveva riconosciuto il carattere vegetale delle membrane che si formano alla superficie dei liquidi che acetificano e diede il nome di *Mycoderma* ai microrganismi che producono queste membrane. Nel 1837-38 Turpin e Kützing <sup>12)</sup> formulavano l'ipotesi che la fermentazione acetica fosse causata da microrganismi e Kützing diede una descrizione di questi per i quali propose il nome di *Ulvina aceti*.

Nel 1864 Pasteur in una memoria sulla fermentazione acetica <sup>13)</sup> in op-

posizione all'ipotesi meccanico-chimica, strenuamente difesa da Liebig, dimostrò che ogni qual volta un liquido dà luogo alla fermentazione acetica, presenta alla sua superficie un microrganismo organizzato, e che in mancanza di esso ogni formazione di aceto è impossibile. Pasteur descrisse questi microrganismi, che si presentano riuniti in catene, i cui elementi, di diametro variabile (media  $1,5 \mu$ ) e di lunghezza di circa  $3 \mu$ , sono generalmente strozzati nella loro metà. Ad essi diede il nome di *Mycoderma aceti*. Chi desiderasse conoscere queste magistrali ricerche e le eleganti descrizioni di Pasteur, potrà leggere la memoria originale ed il capitolo relativo nel trattato classico di Duclaux <sup>14</sup>).

La natura microbica del processo di acetificazione, già intravveduta, come si è visto, da altri autori, fu definitivamente dimostrata da Pasteur, il quale accertò che bastava esporre all'aria un miscuglio di vino e aceto, allungato con acqua, per determinare la comparsa di un velo sottile, fragile e di aspetto vellutato, che col tempo diventa più rugoso e resistente, costituito da vegetazioni del *Mycoderma aceti*.

Nel suo lavoro Pasteur trattò il problema dal solo punto di vista biologico e non si preoccupò della questione di specie. Solo in seguito ci si avvide che numerose specie di microrganismi possono dare luogo alla acetificazione e questi differiscono morfologicamente gli uni dagli altri, sia nell'aspetto sia nella forma della loro membrana, sia nella velocità del processo di acetificazione, nel rendimento, ecc.

Nel 1879 Hansen, applicando per la prima volta a questo problema il metodo delle colture pure, stabilì l'esistenza di due nuove specie, al tutto simili fra loro, che si differenziano per il loro comportamento di fronte allo iodio, che colora l'una in azzurro, l'altra in giallo. Esse sono l'*A. pasteurianum* e l'*A. aceti*.

Nel 1886 A. Brown, studiando la madre dell'aceto, purificata col metodo del frazionamento e della diluizione, isolò un'altra specie acetificante, caratterizzata dalla formazione di membrane gelatinose e resistenti, alla quale diede il nome di *Bacterium xylinum*.

Infine nel 1897-98 Henneberg studiò e definì nuove specie acetificanti: *A. oxydans*, *acetigenum*, *industrium* ed *ascendens*; l'enumerazione potrebbe continuare con le specie descritte da Beijerinck, Peters, Lindner, Lafar ed altri. I caratteri differenziali di questi microorganismi e di alcuni di quelli, ai quali abbiamo accennato, sono spesso incerti e di difficile descrizione. Essi sono quasi esclusivamente rappresentati da leggere differenze morfologiche e dal diverso aspetto delle membrane, ma entrambi questi caratteri sono spesso variabili e mal definiti. L'aspetto delle membrane, la loro colorazione con lo iodio sono talora modificati dalle condizioni dell'ambiente e anche i caratteri biologici dei vari microrganismi non risultano costanti nelle ricerche dei vari autori, a causa forse della diversa composizione dei substrati. I terreni di coltura solidi, che potrebbero giovare allo studio del problema, a poco servono nel caso dei batteri acetificanti, perchè essi danno luogo a banali patine mucose, di colore bianco, poco caratteristiche.

Quanto abbiamo finora detto non incoraggia gli studiosi ad una classificazione dei batteri acetificanti e i dati che noi possediamo ci forniscono

Arabinoso . . . . .	Bct. Industrium	Bct. oxydans	Termobacter. aceti	Bct. aceti	Bct. acetosum	Bct. Künzingianum	Bct. Pasteurianum	Bct. acetigenum	Bct. ascendens	Bct. Schützenbachii	Bct. curvum	Bct. orleanense	Bct. xylinoides	Bct. xylinum	Bct. vini acetati
Levuloso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Destroso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Galattoso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Sorboso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Saccaroso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Maltoso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Lattoso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Raffinoso . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Destrina . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Amido . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicogeno . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Inulina . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Alcool metilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» etilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» propilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» isopropilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» butilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» isobutilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
» amilico . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicole cilenica . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Glicerina . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Eritrite . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Mannite . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++
Dulcite . . . . .	+	+++++									+++	+++	+++	+++	+++

	Formazione di membrana	risale sulle pareti	colorazione con iodio	intorbidamento del liquido	forme cellulari ipertroiche	Mobilità	TEMPERATURA		Quantità di alcool che ancora permette lo sviluppo	Quantità di acido acetico
							optimum	massima		
1	<i>B. oxydans</i>	++	--	+++	+++	++	18-21	30-33	7	ca. 2
	<i>B. industrium</i>	+	--	+++	++	++	23	35	6-7	2,7
2	<i>B. aceti</i>	--	--	--	+	--	34	42	11	6,6
	<i>B. pasteurianum</i>	--	--	--	frequen	--	34	42	9,5	6,2
	<i>B. kützingianum</i>	++	++	++	rare	--	34	42	9,5	6,6
	<i>B. acetosum</i>	poco	--	++	+	--	28	36	11	6,6
	<i>B. rancens</i>	+	--	poco	++	--	--	--	--	--
Termobacter aceti										
3	varie forme	++	--	++	++	++	--	--	9	6
	robusta	--	+	--	+	--	28	35	--	--
	spessa, tenace	++	++	--	+	--	30	35-36	--	--
	tenue, uniforme	+++	--	+++	frequen	--	26-33	34	6-7	4,5
4	<i>B. acetigenum</i>	--	+	+	rare	+	33	--	7	3,5
	<i>B. Schützenbachii</i>	--	--	+	--	--	25-27	31-35	--	11,5
	<i>B. curvum</i>	--	--	+	--	--	30	ca. 38	--	--

1) batteri del mosto di birra - 2) batteri della birra - 3) batteri del vino - 4) batteri a fermentazione rapida.

appena elementi sufficienti per la determinazione in grandi gruppi. Malgrado ciò, Beijerinck, Rothenbach ed Henneberg cercano di risolvere tale problema, ma le discussioni fra loro avvenute dimostrano una volta ancora la difficoltà della questione. Tralasciamo di parlare della classificazione di Beijerinck <sup>15)</sup> e di Rothenbach, accenneremo brevemente solo a quella di Henneberg <sup>16)</sup> che è anche quella adottata da Jörgensen e Hansen nel loro recentissimo libro <sup>17)</sup>. Questa classificazione è basata su caratteri fisiologici e su considerazioni di indole pratica e industriale. Essa comprende:

1) Schnelllessigbakterien, batteri a fermentazione rapida del processo di Schützenbach, che danno raramente luogo a formazione di zooglee. Essi comprendono l'*A. acetigenus*, l'*A. Schützenbachii* e l'*A. curvum*.

2) I batteri della birra, al quale gruppo appartengono l'*A. aceti* e il *Termobact. aceti*, isolati dalla birra a bassa fermentazione, l'*A. pasteurianum*, l'*A. kützingianum* e l'*A. acetosum*, isolati dalla birra ad alta fermentazione.

3) I batteri del mosto di birra: *A. oxydans*, *A. industrium*.

4) I batteri del vino: *A. xylinum*, *A. xylinoides*, *A. orleanense* e l'*A. Ascendens*.

Wisserx' Hoff <sup>18)</sup> in un recente lavoro sul genere *Acetobacter*, pur non nascondendo la necessità di ulteriori ricerche morfologiche e culturali, ha proposto una classificazione puramente fisiologica delle specie dell'*Acetobacter*. Tale classificazione rappresenta un progresso sulle precedenti ed è riprodotta nel classico manuale del Bergey <sup>19)</sup>.

Noi ci limiteremo a riepilogare i comuni caratteri morfologici e culturali dell'*Acetobacter* nella precedente tabella di Jörgensen, pag. 85 <sup>20)</sup>. Ci pare interessante ancora richiamare alcuni dati di acetificazione dei batteri dell'aceto, dati che possono servire a caratterizzarli. L'*A. vini-acetati* (Henneberg) è generalmente molto acetificante, mentre l'*A. xylinum* è relativamente poco acetificante. Si è tuttavia osservato in alcuni casi una ossidazione successiva, e ciò avviene ad es. per il glucosio con l'*A. xylinum* e l'*A. xylinoides*; quest'ultimo dà luogo a ossidazioni successive del saccarosio e della glicerina. L'*A. vini-acetati* acidifica molto il levuloso, il galattosio, il raffinoso. L'*A. curvum*, l'*A. orleanense* acetificano bene anche la destrina. Tutti i batteri acetificanti ossidano l'acool propilico, e l'*A. Schützenbachii*, l'*A. orleanense* e l'*A. vini-acetati* anche la glicerina.

Queste ricerche furono fatte con estratti di lievito al quale venivano aggiunti i rispettivi zuccheri (2-3%) e alcoli. Molti di questi microrganismi danno luogo alla formazione di acido ossalico.

Henneberg riassume nella tabella a pag. 86 questi caratteri differenziali <sup>21)</sup>.

\*\*\*

L'acetificazione dei liquidi alcoolici è un caso tipico di fermentazione ossidativa ed è dagli enzimologi studiata con particolare predilezione quale conferma delle moderne teorie di Wieland <sup>22)</sup>.

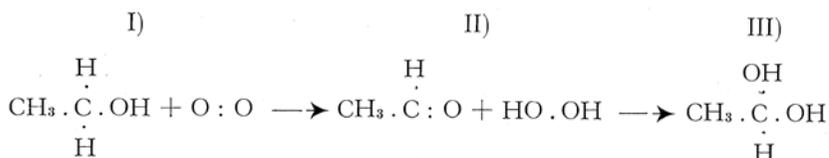
Come è noto, per il Wieland l'azione dei fermenti, che intervengono come acceleratori nelle ossidazioni biologiche, è di favorire una deidrogenazione, rendendo l'idrogeno suscettibile di entrare in reazione con l'ossi-

gena molecolare. Un modello di tale reazione è la ossidazione catalitica dell'alcool in aldeide per mezzo del nero di platino.

Al contrario di quanto avverrebbe secondo l'ipotesi del Warbourg in questo caso non è l'ossigeno che viene attivato, ma bensì l'idrogeno dell'alcool, che quindi si può unire all'ossigeno molecolare. Che l'ossigenazione non sia necessaria, è provata dal fatto che la reazione avviene anche in assenza di ossigeno, purchè esista un accettore di idrogeno (chinone o bleu di metilene).

Nella fermentazione acetica l'alcool viene dapprima ossidato in aldeide acetica e questa ad acido acetico. Nella pratica dell'acetificazione, in cattive condizioni di fermentazione, si possono formare quantità notevoli di aldeide acetica, che si può separare trattando con solfiti. Nella trasformazione dell'alcool in aldeide acetica, si tratta di una deidrogenazione: la successiva trasformazione dell'aldeide (del suo idrato) in acido acetico è anche essa una deidrogenazione. La fermentazione acetica si può quindi formulare nei modi seguenti.

In condizioni aerobiche, partendo dall'alcool, si passa all'aldeide ed al suo idrato:



che a sua volta si trasforma in acido acetico:

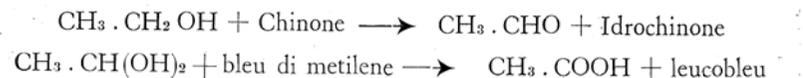


In condizioni anaerobiche, una molecola di aldeide idrata reagisce con una molecola di aldeide dando origine ad acido acetico e a nuovo alcool:



In questo caso è l'aldeide acetica che funziona da accettore di idrogeno. L'acqua ossigenata formatasi nel primo schema è scissa in acqua e ossigeno da una catalasi.

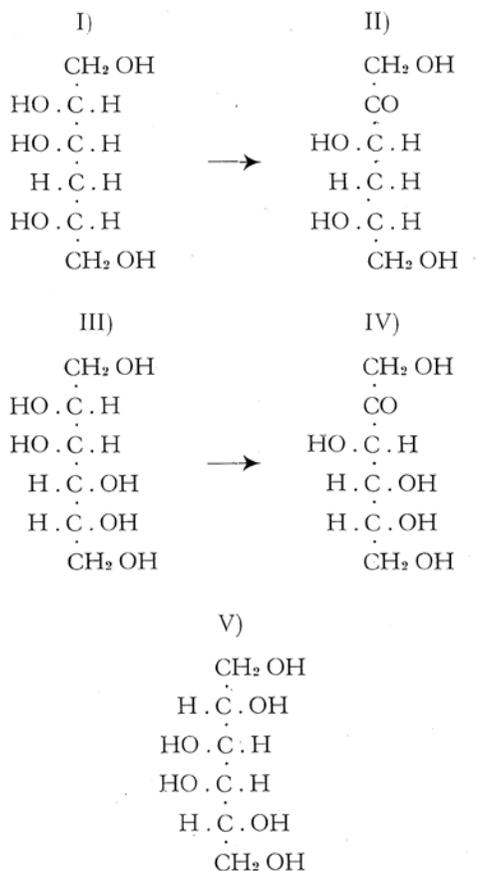
Invece dell'ossigeno o dell'aldeide acetica possono prendere parte alla deidrogenazione sostanze estranee, come accettori di idrogeno [---] mente violetto di metilene e chinone.



Oltre alla fermentazione acetica importanti sono le ossidazioni, date dalle varie specie di batteri acetificanti, degli zuccheri e degli alcoli corrispondenti e le ulteriori ossidazioni di essi: noi le passeremo brevemente in rassegna nell'ordine seguente:

- a) ossidazioni degli alcoli a zuccheri;
- b) ossidazioni degli zuccheri ai loro acido-derivati;
- c) successive ossidazioni di questi acidi.

a) La trasformazione degli alcoli a zuccheri ubbidisce ad alcune norme, note col nome di *regola di Bertrand*. Non tutti gli alcoli si trasformano in chetasi, ciò avviene solo per quelli che soddisfano ad alcune



condizioni stereochimiche. Secondo Bertrand l'ossidazione avviene quando il gruppo ossidrilico da ossidare sia vicino ad un secondo gruppo ossidrilico in posizione *cis*, quindi la sorbite passa a sorboso (I, II), la mannite a levuloso, mentre la dulcite (V) non viene ossidata:

Furono osservate alcune deviazioni da questo schema, dipendenti da peculiarità del substrato.

Nulla si conosce sperimentalmente sul chimismo e l'enzimologia di queste ossidazioni. Probabilmente anche qui si verifica una deidrogenazione di questo tipo:



Il glicole etilenico passa ad acido glicolico in presenza dell'*A. aceti*, *A. suboxydans*, *A. xylinum* e *A. melanogenum*.



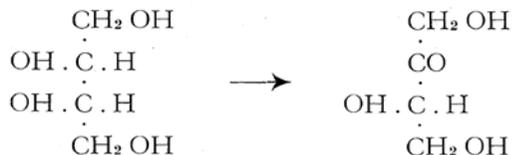
Analogamente il glicole propilenico ed il glicole 2, 3 butilenico in presenza di *A. xylinum* e di *A. suboxydans* si ossidano rispettivamente ad acetolo ed a acetoina (dimetilchetoso).



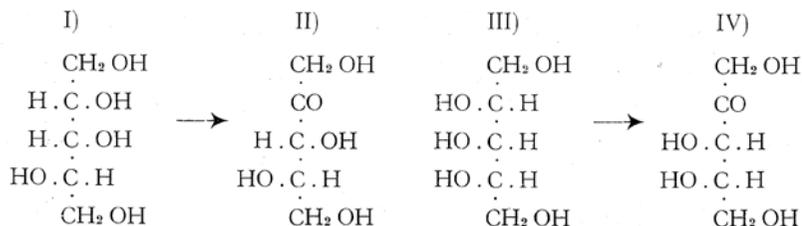
La glicerina viene ossidata a diossiacetone per opera dell'*A. xylinum*, *A. suboxydans*, ed altri batteri del gruppo.



L'acool a 4 atomi di carbonio, eritrite, viene ossidato a chetoso (1-eritruoso) per azione dei microrganismi precedenti:



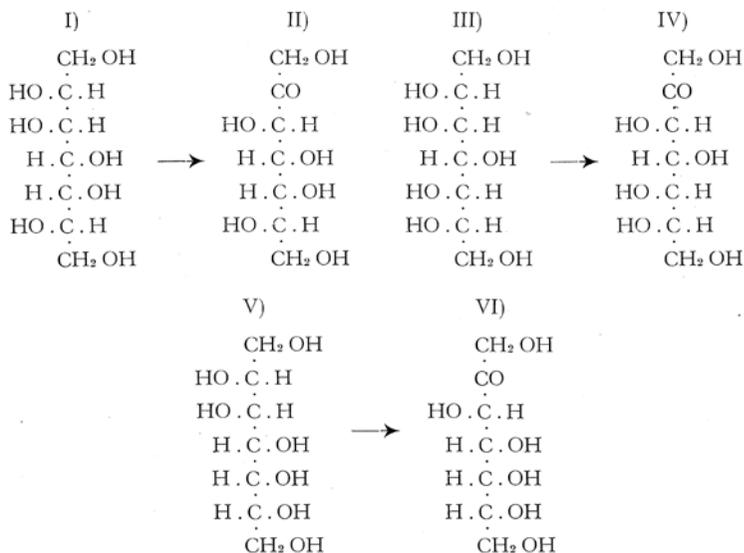
Dei composti a 5 atomi di carbonio, l'arabite (I) e l'adenite (III) si trasformano nei rispettivi chetopentosi: xylochetoso (II) e adonoso (IV). Il primo di questi era già stato studiato da Bertrand mentre il secondo venne solo ottenuto recentemente:



La sorbite che è stata oggetto delle classiche ricerche di Bertrand, dà luogo alla formazione di sorboso, per azione di un bacillo acidificante che egli denominò bacillo del sorboso e che poi si dimostrò essere l'*A. xylinum*.

Analogamente la mannite passa a fruttosio, mentre la dulcite e l'idite, a causa della loro costituzione, non reagiscono in presenza dell'*A. xylinum*.

Gli alcoli a 7 atomi di carbonio si ossidano nei rispettivi chetosi: la perseite passa a perseuloso (I, II), la a-d-glucoeptite a 1-glucoeptuloso (III, IV) e la volemite a sedoeptuloso (V, VI).



Anche dal a, b, d-glucoctite si ottenne un chetoctoso.

Incerta invece è la formazione degli aldosi dei rispettivi alcoli. Hermann e Neuschul ottennero mannoso dalla mannite e galattoso dalla dulcite con *A. kützingianum* e *A. gluconicum*, però tali risultati attendono ulteriore conferma.

b) Già prima degli studi esatti sulla morfologia dei bacilli acetificanti, Boutroux nel 1880 aveva osservato la formazione di acido gluconico dal glucoso per azione dei germi dell'aceto. In seguito questa azione fu confermata e si avvide che essa era dovuta all'*A. aceti*, *A. xylinum*, *A. Kützingianum*, *A. pasteurianum*, e ad altri molti microrganismi dell'aceto.

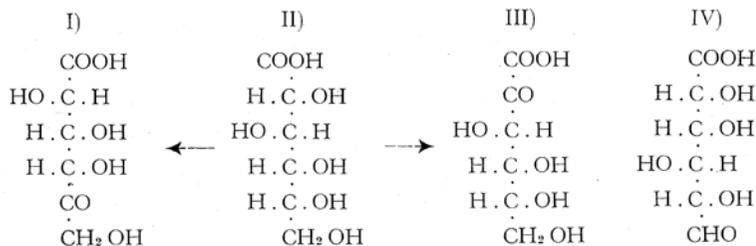
Recentemente fu isolato l'*A. gluconicum* dal *Kombucha* <sup>1)</sup> e nuove

1) *Kombucha*: è una bevanda usata in Cina, che si prepara trattando the zuccherato con batteri acetificanti.

specie di bacilli acidificanti dal *Hoshigaki* <sup>1)</sup> che danno un rendimento quasi quantitativo in acido gluconico. Però questo importante prodotto terapeutico, del quale in america si producono 250.000 kg. annui, si ottiene industrialmente con l'*Aspergillus niger* e con l'*A. chrysogenum*.

Altri aldosi vengono ossidati nei rispettivi acidi: d-mannoso in acido d-mannonico per mezzo dell'*A. gluconicum*, il d-galattoso in acido d-galattosico con vari batteri del gruppo, e l-arabinoso e l-xiloso in acido l-arabonico e acido l-xilonico per opera dell'*A. xylinum* ed altri.

c) L'ossidazione successiva dell'acido gluconico (II) può avvenire in tre modi differenti, in dipendenza della posizione dell'ossidile ossidato. Da lungo tempo era nota la formazione di acido d-5-chetogluconico (I) per azione dell'*A. xylinum* e altri germi dell'aceto, mentre solo recentemente si ottenne l'acido d-2-chetogluconico (III) dal gluconato di calcio per mezzo dell'*A. suboxydans* e un altro prodotto di ossidazione, l'acido aldeidgluconico (IV), che si ottiene con speciali razze dell'*A. indurium* var. *Hoshigaki*.



L'acido d-mannonico con *A. suboxydans* forma l'acido 2-chetogluconico. Dal d-fruttosio, secondo Hermann e Neuschul, per opera dell'*A. gluconicum* si otterrebbe acido chetogluconico, ma i risultati attendono ancora conferma. Anche l-sorboso darebbe luogo alla formazione di piccole quantità di acidi riducenti.

Dal d-fruttosio per opera di speciali bacilli acidificanti si ottengono quantità notevoli di acido *Koji* (cogico) <sup>2)</sup> il quale però generalmente si ha per azione di aspergilli (*A. orizae*, *A. glaucus*) dal d-glucosio, saccarosio, fruttosio, inulina, amido, ecc.

\*\*\*

Fu Adrian J. Brown <sup>23)</sup> che nel 1886 in una sua memoria « sul fermento acetico che forma la cellulosa » isolò e descrisse l'*A. xylinum*.

Egli ottenne il microorganismo in colture pure partendo dalla madre dell'aceto e procedendo col metodo della diluizione, analogamente a quanto aveva fatto nei suoi lavori precedenti.

1) *Hoshigaki*: i batteri dell'Hoshigaki furono isolati dal malto fermentato preparato coi frutti di *Diospyros Kaki* (in giapponese = Hoshigaki).

2) *Koji*: è una sostanza che si ottiene dal riso nella preparazione del Saké o birra giapponese.

Riteniamo interessante per la trattazione del nostro tema riferire per esteso i particolari sperimentali di questa classica memoria.

Il terreno di coltura usato era composto di vino rosso diluito a metà con acqua e reso acido con acido acetico all'1% sotto forma di aceto comune. Questo terreno favorisce la coltura di tutti i batteri acetificanti ed arresta lo sviluppo di altri microrganismi.

Per definire meglio la purezza delle colture furono fatti trasporti su gelatina e mosto di birra. In dieci giorni circa su questi terreni cominciano a svilupparsi colonie distinte che trasportate in mezzi liquidi, danno origine a formazione di membrane.

Quando queste si sviluppano in liquidi di coltura adatti, si osserva dapprima una massa traslucida simile a gelatina alla superficie del liquido. L'accrescimento è rapido e tutto il liquido si copre di una membrana che in condizioni propizie può raggiungere uno spessore fino a 25 mm. Per agitazione del recipiente, la membrana, leggermente più pesante dell'acqua, si ricopre di liquido e sulla sua superficie si inizia la formazione di una seconda membrana: possono attenersi successivamente 5-6 strati. La membrana è bianca, traslucida e, se il liquido è colorato, essa assume talora il colore di questo.

Quando la *madre dell'aceto* si coltiva su mezzi non adatti ad es. acqua di lievito, si osserva dapprima una leggera pellicola al fondo del recipiente che a poco a poco lo riempie. Quando il microbo cresce su gelatina addizionata a malto si formano colonie sferiche, le quali si riuniscono in membrana. Questi batteri non liquefano la gelatina.

Nelle colture pure dell'*A. aceti* si forma una zooglea molto delicata e fragile, che per la sua resistenza molto minore differisce dalla tenace membrana dell'*A. xylinum*. Il comportamento chimico delle due specie di membrana è pure assai diverso.

Una soluzione di potassa a freddo disintegra completamente la zooglea dell'*A. aceti*, mentre la membrana dell'*A. xylinum* resiste più ore alla ebollizione con idrato di sodio. Trattando la membrana di *A. aceti* con acido solforico concentrato addizionato a iodio non si ha colorazione, mentre quella dell'*A. xylinum* dà una colorazione azzurra intensa; analoga reazione è data dallo iodio sciolto in cloruro di zinco. Brown pensa di conseguenza che queste due membrane siano dovute a due specie distinte.

La *madre dell'aceto* esaminata al microscopio appare formata da una inclusione di batteri più o meno allineati, in una membrana trasparente.

Questi batteri, di 2  $\mu$  di lunghezza, sono spesso riuniti fra di loro in catene. La colorazione con violetto di anilina (malveina) dimostra i batteri ben distinti, mentre la membrana rimane incolore. In vecchie colture si osservano forme arrotondate, come di cocchi, di 0,5  $\mu$  di diametro. Alcune volte nelle colture si trovano germi di 10-30  $\mu$  di lunghezza. A temperatura di 28°, si ha l'optimum di sviluppo: a 36° non si osserva più sviluppo, ma il batterio si conserva vivente. (continua)