

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

G. A. BROSSA

(Ricevuto il 2 marzo 1942-XX)

(Continuazione vedi fascicolo precedente)

Le fermentazioni dell'*A. xylinum* sono le stesse di quelle prodotte dall'*A. aceti*. L'alcool etilico si ossida in acido acetico, il glucosio in acido gluconico e la mannite in levuloso. Come l'*A. aceti*, esso non ha azione fermentativa sul saccarosio, l'amido e il levuloso.

Per accertare la natura delle membrane prodotte dall'*A. xylinum*, l'autore le lava con acqua e le bolle per dieci minuti in una soluzione al 10 % di idrato potassico. A questo modo si distruggono i contenuti cellulari, mentre le pareti costituenti la membrana rimangono inalterate. Si depura, sempre secondo Brown, trattando con acido cloridrico, bromo e intercalando lavaggi a fondo con acqua. Il prodotto finale è una membrana incolore semitrasparente, che al microscopio non dimostra alcuna struttura. Trattata con liquido cuproammoniacale si scioglie facilmente e la soluzione filtrata, acidificata con acido cloridrico, dà un precipitato esattamente simile a quello del cotone trattato allo stesso modo. L'acido solforico concentrato scioglie la membrana, senza annerirla, e la soluzione diluita in acqua, bollita riduce il liquido di Fehling. L'analisi elementare della sostanza ha la stessa composizione di quella della cellulosa. Un altro microrganismo che forma membrane simili a quelle descritte è il *Leuconostoc mesenteroides*, ma queste sono formate, secondo Brown, da gomma e destroso.

Per dimostrare le proprietà di sintesi dell'*A. xylinum* il Brown fece semine di *madre dell'aceto* in mezzi minerali di Pasteur, addizionati rispettivamente a saccarosio, amido o alcool al 3%, mantenendo i terreni a temperatura di 28° per 6 settimane: ad eccezione del destroso essi non diedero luogo ad alcun sviluppo. Dal terreno contenente destroso si formarono membrane piccole, ma caratteristiche.

Migliori risultati si ottengono con acqua di lievito addizionata a destroso all'1 %. Dopo 15 giorni di fermentazione le membrane sviluppatesi su di esso pesavano 0,0227 gr., mentre membrane sviluppatesi su saccarosio e amido pesavano appena pochi milligrammi (0,005). La formazione di cellulosa dal destroso dimostra quindi che il germe possiede funzioni sintetiche.

Furono ancora fatte altre esperienze comparative con destroso, mannite e levuloso (2 gr. di zucchero addizionati a 100 di lievito): il primo idrato di carbonio dà luogo alla formazione di 0,0172 gr. di cellulosa, la mannite a 0,0948 e il levuloso a 0,106 gr. <sup>1)</sup>.

---

<sup>1)</sup> Dei 2 gr. di levuloso impiegato ne scompaiono 0,314 e la membrana formatasi pesa 0,164 gr. e contiene 0,055 gr. di cellulosa. Quindi almeno 0,113 gr. dello zucchero

La *madre dell'aceto* viene usata nelle campagne per la fabbricazione domestica dell'aceto, introducendo una membrana del fermento in soluzioni di zucchero bruno greggio. Il fermento non ha azione sul saccarosio e, se ciò avviene, le membrane esaminate ai microscopio dimostrano la presenza del comune *Saccharomyces cerevisiae*. Questo inverte il saccarosio e fermenta lo zucchero formatosi, dando luogo ad alcool. Finita la fermentazione, l'alcool si ossida in acido acetico e si ha la formazione di membrana alla superficie.

Una diecina di anni appresso G. Bertrand riuscì a fare la preparazione del sorboso servendosi di un batterio che egli ritenne simile o identico all'*A. xylinum*. Ci pare interessante riferire alcuni particolari del suo lavoro <sup>24</sup>).

Pelouze scoprì nel 1852 il sorboso nel succo di sorbe, che lasciava a riposo per un anno, mentre molti altri non riuscirono a ritrovare il sorboso, nè nel succo fresco di sorbe nè nel succo fermentato. Il Bertrand chiarì questa differenza, dimostrando la formazione del sorboso, in seguito ad infezione del succo di sorbe per opera di mosche dell'aceto (*Drosophila funebris*). Quando tali mosche depongono le loro uova nel succo, la pellicola che lo ricopre cambia aspetto diventando gelatinosa e consistente. Anche dopo la nascita delle larve, la loro trasformazione in mosche e la loro scomparsa nella stagione fredda, la membrana continua ad aumentare, mentre il liquido sottostante riduce fortemente il Fehling per la presenza di sorboso. Le membrane sono costituite di batteri di 2-3  $\mu$  di lunghezza e 0,5  $\mu$  di diametro riuniti da una sostanza gelatinosa. Sotto la loro azione la sorbite, contenuta nel succo di sorbe, si trasforma in sorboso. I germi del microrganismo sono trasportati dalle *Drosophila*, che si erano prima infettate su altri liquidi, oppure su aceto.

Il Bertrand per la preparazione del sorboso procedeva nel modo seguente: cominciava a preparare il fermento specifico lasciando all'aria un miscuglio di vino addizionato in parti uguali con aceto e diluito con due volumi di acqua, oppure partendo da succo di sorbe fermentate e diluite con acqua in parti uguali. Il batterio si sviluppava in colonie gelatinose, confluenti in membrane resistenti. Ottenuto il fermento si insemnava il liquido nutritizio (peptone all'1 % mineralizzato ovvero addizionato ad acqua di lievito) a cui si aggiungeva sorbite. Il liquido contenuto in pallone fino ad una altezza di qualche centimetro, posto in termostato a 25° diventava nettamente acido. Quando la sua azione riduttrice sul liquido di Fehling non aumentava più, si purificava con sotto-acetato di piombo e concentrava, si ottenevano così cristalli di sorboso.

Vincent e Delachanel <sup>25</sup>) avevano nel frattempo ottenuto con il fermento specifico del sorboso, levuloso dalla mannite. Bertrand <sup>26</sup>) estese le sue esperienze a diversi alcoli: glicole etilenico, xilite, dulcite, glicerina, eritrite, arabite, sorbite, mannite e perseite. I tre primi non vengono attaccati dal fermento, mentre gli altri vengono trasformati negli zuccheri relativi e la glicerina in diossiacetone.

scomparso si trasforma in cellulosa, il rimanente serve al metabolismo dell'*Acetobacter*. Dei 2 gr. di glucosio ne scompaiono 1,111 di cui 0,720 si trasformano in acido gluconico e il rimanente serve alla formazione della membrana ed allo sviluppo del microrganismo.

L'argomento delle fermentazioni date dall'*A. xylinum* fu ripreso da M.me C. Khouvine <sup>27)</sup> e formò oggetto di quattro comunicazioni fatte nel 1932-34.

Già H. L. A. Tarr e H. Hibbert avevano studiato le condizioni nelle quali l'*A. xylinum* sintetizza la cellulosa dagli zuccheri e da composti affini. Tale sintesi avviene partendo dagli esosi e da composti che facilmente si possono trasformare in esosi (mannite e glicerina), non avviene invece dell'arabinoso, xiloso, glicole e poliglicoli e eritrite. Gli autori americani non studiarono che il rendimento in cellulosa, non preoccupandosi del meccanismo della sintesi: questa fu la ragione per la quale M.me Khouvine riprese le esperienze coltivando l'*A. xylinum* sopra alcoli polivalenti. A 200 cc. di acqua di lievito, si aggiungono 6 gr. dell'alcool da studiare e si sterilizza in autoclave per 20' a 110-115° in un pallone tarato da 5 l. di vetro Pyrex. Si semina poi con una particella di zooglea di una cultura di qualche giorno. Il pallone è chiuso da un tappo di gomma attraversato da un tubo, che permette l'entrata dell'aria, ma non l'uscita dei gas formati, che possono prelevarsi da una tubatura laterale.

La reazione del mezzo è determinata con l'elettrodo a chinidrone: prima della fermentazione ha all'incirca un pH = 7, a fermentazione avvenuta il pH discende a 6,5 per la sorbite e a 4,5 per la mannite.

Riprenderemo altrove la disposizione e la discussione dei dati delle esperienze della Khouvine.

Nell'anno 1932 è comparso uno studio coi raggi X della cellulosa dell'*A. xylinum*, eseguito da M.me Khouvine, G. Carpentier, R. Sutra <sup>28)</sup>, il lavoro è giustificato dal fatto che nonostante le reazioni sopra riportate (Brown) alcuni studiosi, (Beijerinck, Emmerling) sostenevano essere le membrane prodotte dall'*A. xylinum*, formate da chitina <sup>29)</sup>. Prima della Khouvine, H. Hibbert e R. Barsha <sup>30)</sup> avevano confermato che le membrane dell'*A. xylinum* presentavano carattere simile alla cellulosa, che si potevano acetilare e che davano diagrammi ai raggi X simili alla cellulosa vegetale. Le esperienze della Khouvine su colture dell'*A. xylinum* su alcoli (glicerina, sorbite, ecc.) diedero membrane che confermarono i risultati di Brown e di Hibbert.

La cellulosa dell'*A. xylinum* è più resistente della cellulosa del cotone e si avvicina alla cellulosa dei Tunicati (Polycarpa, Phallusia, Ascjdia), sempre secondo gli autori succitati, si può mercerizzare, solo dopo un soggiorno di parecchie ore in idrato sodico al 20 %, e si può difficilmente nitrare ed anche difficilmente sciogliere in liquido di Schweizer.

R. Sutra <sup>31)</sup> ritornò ancora sull'argomento. Egli purificò la cellulosa dell'*A. xylinum* esaurendo prima con l'apparecchio di Kumagava, dosò l'azoto che trovò essere 1,8 %, (mentre per la chitina dovrebbe essere 6,9 %). Trattando con idrato sodico al 2 % a bagno-maria fino a decolorazione, poi con ipoclorito a 0,5 % e lavando infine con acqua, alcool ed etere trovò che praticamente non vi è più presenza di azoto (l'azoto precedentemente trovato sarebbe quindi dovuto al protoplasma batterico).

Anche R. Stura studia i preparati ai raggi X e ne confronta i diagrammi con quelli ottenuto dalla cellulosa dei Tunicati.

\*\*\*

La *madre dell'aceto* non manca mai nella fabbricazione dell'aceto dal mosto, dalla birra e dal vino. La formazione di membrane mucilaginoso è frequente anche nella produzione dell'alcool, della birra ad alta fermentazione e nella preparazione dei cetrioli acidi. Henneberg, studiò in modo esauriente l'*A. xylinum* mettendolo a confronto con gli altri batteri acetificanti del vino (*A. ascendes*, *A. vini-acetati*, *A. xylinoides* e *A. orleanense*). Riteniamo opportuno richiamare la magistrale esposizione di Henneberg, che, coi suoi studi sui microrganismi dell'acetificazione, si acquistò in materia una indiscutibile autorità <sup>32</sup>). Diremo dapprima della formazione delle membrane e poi della morfologia.

Sul mosto di birra agarizzato le colonie dell'*A. xylinum* presentano un aspetto umido lucente, bruno pallido e sono tondeggianti, ombelicate con superficie un po' granulosa. Dopo due settimane a 30° raggiungono circa 2 mm. di diametro. Nell'acqua di condensazione delle provette a becco di clarino di mosto agarizzato si formano le membrane biancastre caratteristiche di questo batterio. Su birra gelatinizzata senza aggiunta di zucchero, le membrane sono sottili, invece con aggiunta di zucchero al 10% si ha la formazione di membrane rigogliose e resistenti. Su vari liquidi, ad esempio vino acidificato, birra, estratto di lievito zuccherato, mosto di birra o di cereali, ecc. l'*A. xylinum* dà sempre luogo a formazione di membrane spesse e resistenti, dapprima trasparenti, poi bianche, che già dopo qualche giorno non si riescono a rompere con l'ago di platino e che dopo qualche tempo presentano allo strappo una resistenza notevole.

La formazione delle membrane avviene su tutta la superficie del liquido: esse hanno l'aspetto di masse gelatinose trasparenti, che si presentano dapprima come isolotti sparsi a margine trasparenti, ispessiti al centro, che assomigliano ai frutti di olmo. Facilmente la membrana per il suo peso affonda nel liquido ed alla superficie se ne forma una nuova. Se si fa la semina in liquidi nutritivi di pezzi di membrana, dal fondo del recipiente si innalzano filamenti mucilaginosi, fini e delicati, che, attraversando il liquido, tendono a raggiungere la superficie, dando luogo alla formazione di una solida membrana.

L'*A. xylinoides* in determinate condizioni può formare membrane del tutto simili a quelle dell'*A. xylinum*. Lo stesso avviene, benchè raramente, in vecchie colture dell'*A. orleanense*. Le membrane dell'*A. xylinoides*, a differenza di quella dell'*A. xylinum*, si presentano sottili e solo in seguito diventano spesse e tenaci. I caratteri delle membrane dell'*A. xylinoides* non sono uniformi: esse possono essere sottili e secche, simili a carta seta, oppure fiocose e mucilaginoso e infine, come si disse, del tutto analoghe a quelle dell'*A. xylinum*. Fra questi tipi si osservano tutte le possibili forme di passaggio, che possono essere presenti in uno stesso liquido di coltura. Su un estratto di lievito zuccherato la membrana dell'*A. xylinum* e dell'*A. xylinoides* sono uguali e si possono solo distinguere in successivi passaggi su mosto di birra agarizzato. L'*A. xylinum* presenta allora membrane secche, bruno-chiare, mentre l'*A. xylinoides*

dà luogo a formazioni di masse mucilaginose trasparenti, contenenti minuti precipitati giallo-bruni.

Le membrane dell'*A. xylinum* superano lo spessore di 1 cm. ed in condizioni favorevoli raggiungono parecchi centimetri: quando esse sono secche danno luogo a lamine sottili simili a ortica. Esse prendono la forma del recipiente che le contiene: ad es. nelle bottiglie di birra chiara di Berlino (Weissbier) si osservano formazioni lunghe, cilindriche, digitiformi; nelle scatole di latta di cetrioli acidi, si formano alla superficie dischi piatti, rotondi, ecc. Nei grossi tini dell'aceto queste membrane possono raggiungere il diametro di un metro e più col tempo, in buone condizioni di nutrizione hanno uno spessore di 20-30 cm. e un peso considerevole. Nei trucioli di faggio, che servono nella fabbricazione rapida dell'aceto, le membrane assumono un aspetto irregolare.

La formazione della membrana dell'*A. xylinum* già da lungo tempo aveva richiamato l'attenzione dei fabbricanti di aceto e dei farmacisti, specialmente di questi ultimi, che talvolta trovavano le loro preparazioni invase da masse gelatinose. Nella vicinanza del collo delle bottiglie si formavano tappi microbici, che, a causa del loro peso, facilmente si staccavano e andavano a fondo; si formavano allora nuovi tappi, che a loro volta si staccavano, in modo da riempire tutte le bottiglie di dischi gelatinosi. Spesso nelle bottiglie di aceto si osservano membrane cilindriche a forma di candela, che partendo dal tappo, raggiungono il fondo della bottiglia.

L'*A. xylinum* si presenta in forma di bastoncini di varia lunghezza, allungati o filiformi. Sono caratteristici i filamenti spirali o irregolari: frequenti le forme ipertrofiche. Spesso i batteri si presentano riuniti in catene, a segmenti più o meno regolari. La cellula batterica è arrotondata, raramente aguzza all'estremità. Le forme ipertrofiche sono presenti nel mosto di birra al quale venne fatta aggiunta di alcool: su questo terreno si sviluppano anche catene regolari o irregolari e si osservano, specialmente in vecchie colture, filamenti senza tracce di segmentazione.

In aceto di vino, diluito a parti uguali con acqua furono osservate forme cellulari assai diverse fra loro. La prima membrana formatasi dopo una settimana presentava molti filamenti spirali, composti di cellule allungate, talora appuntite, più o meno ricurve. Una seconda membrana, formatasi dopo il distacco della prima, presentava cellule abbastanza lunghe, curve, falciformi; mentre una terza membrana era completamente formata di masse gelatinose, composte di filamenti ricurvi.

In genere le cellule sono diverse nelle varie parti di una stessa membrana, ad es. in un punto esse sono corte, quasi rette, mentre altrove hanno una larghezza 3-4 volte maggiore e formano filamenti sottili, irregolari e angolosi. Su mosto agarizzato gruppi di 30 e più cellule formano fasci disposti parallelamente in modo da dare luogo ad un sottile strato mucosa.

Su birra gelatinizzata senza zucchero il batterio forma cellule quasi prive di mucosità e che, all'opposto di quanto avviene per altri terreni, presentano movimenti molecolari. Spesso si trovano anche qui cellule irregolari e ipertrofiche. Sullo stesso terreno con aggiunta di zucchero predo-

minano filamenti sottili, ricurvi, che includono numerosi cristalli di ossalato di calcio. Su mosto di birra agarizzato con aggiunta di zucchero si formano cellule anormali, ipertrofiche e contemporaneamente cellule piccole, sottili, ricurve.

In preparati in goccia pendente, fatti da mosto addizionato ad alcool, si osservano bastoncini lunghi, sottili, diritti o poco ricurvi, i quali ricordano singolarmente nella forma e nella grandezza le colture del *B. Delbrückii* dell'acido lattico, ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali. Accanto a questi bastoncini si riscontrano filamenti lunghi e sottili e strati di cellule disposti parallelamente. Colture su mosto, dopo cinque giorni, presentano singole cellule di  $0,5 \mu$  di diametro e  $2 \mu$  di lunghezza e filamenti dello stesso diametro e di  $19-27 \mu$  di lunghezza. Su tale terreno si ha un optimum di sviluppo a  $34^\circ$  con estremi a  $26^\circ-35^\circ$ . Su estratto di lievito zuccherato si osserva ancora uno sviluppo a  $38^\circ$ . Passando ora al metabolismo dell'*A. xylinum*, ricorderemo brevemente che esso acidifica in ordine discendente gli zuccheri e gli alcoli seguenti: saccaroso, arabinoso, glucoso, galattoso, raffinoso, glicerina, eritrite, glicole, levuloso e mannite. Non sono acidificati: maltoso, lattoso e destrina. L'*A. xylinum* è l'unico batterio del gruppo che dia luogo a inversione e acetificazione del saccaroso. La mannite viene solo ossidata a levuloso e la sorbite a sorboso. Soluzioni al 12 % di destroso formano al massimo 1,5 % di acido gluconico. Arabinoso, levuloso, galattoso, maltoso, lattoso e raffinoso aggiunti ad estratto di lievito danno luogo a rigoglioso sviluppo dell'*A. xylinum*, ma presentano pochissima produzione di acidi. Destroso, saccaroso e glicerina danno luogo a ulteriori ossidazioni.

L'*A. xylinum* si sviluppa su birra malgrado aggiunte di 2% di acido acetico, 1 % di acido lattico, 1 % di cloruro di sodio, 1 % di nitrato di potassio, 5 % di solfato di magnesio e 8 % di solfato ammonico. Aggiunte di 1,2 % di acido succinico, 1 % di acido malico e 0,5 % di acido tartrico a estratto di lievito permettono ancora lo sviluppo batterico. Henneberg osservò lo sviluppo dell'*A. xylinum* su succo di lampone al quale, per conservarlo, era stato aggiunto 0,4 grammi per litro di acido fluoridrico al 40 %. Lo sviluppo dell'*A. xylinum* avviene ancora in presenza di discrete quantità di alcool (6-7 volumi %).

In presenza dell'*A. xylinum* la formazione dell'aceto avviene solo lentamente e con gravi perdite, dovute a ossidazioni successive: l'aceto non presenta più il suo aroma caratteristico, anzi spesso acquista un odore sgradevole, quindi questo microrganismo è ospite non desiderato dagli acetifici. Tale aceto è anche motivo di contestazione a causa delle masse gelatinose che si formano nelle bottiglie durante il magazzinaggio. Anche da tale punto di vista una pastorizzazione sarebbe consigliabile.

Particolarmente temuta è la presenza dell'*A. xylinum* nella fabbricazione rapida dell'aceto a causa delle masse gelatinose che si formano tra i trucioli e che possono otturare anche le condutture. Si può se non evitare l'inconveniente, almeno limitare i danni, aggiungendo sali adatti invece di birra, facendo bollire i lieviti e simili, ma unico rimedio sicuro è sempre l'impiego di colture pure.

\*\*\*

Talora invece l'azione dell'*A. xylinum* può essere utile in alcune applicazioni di cui brevemente diremo.

1) Il sorboso acquistò industrialmente in questi ultimi anni una grande importanza, poichè tale prodotto serve come materiale di partenza per la preparazione dell'acido ascorbico (vitamina C). La produzione annua del sorboso superò i 50.000 kg. La trasformazione della sorbite in sorboso avviene col metodo di Bertrand, facendo agire l'*A. xylinum* sul succo di sorbe. Oltre l'*A. xylinum* si dimostrarono adatti altri batteri acidificanti dello stesso gruppo, quali l'*A. melanogenum* e l'*A. suboxydans*. L'isolamento e la purificazione del sorboso non presenta difficoltà data la facilità con la quale cristallizza. Con l'*A. suboxydans*, in buone condizioni di ossigenazione (apparecchi di Kluyster e simili), una soluzione al 35% di sorbite dà in 15 giorni, rendimenti del '80%. Buoni risultati si ottennero pure con l'*A. ketogenum*, recentemente isolato dal *Kombucha*. I migliori rendimenti in tempo brevissimo (oltre il 90 % in 24 ore) si hanno con *A. suboxydans*, lavorando con speciali tamburi rotanti per fermentazione e operando sotto pressione di 2-3 atmosfere.

Il sorboso così preparato viene poi trasformato nel derivato diacetico. Dopo ossidazione e allontanamento dei resti acetilici si passa ad acido xylo-2-chetoexonico ed al relativo lattone, dal quale trattando a caldo con acidi diluiti si ottiene l'acido ascorbico.

2) L'*A. xylinum* in unione a lieviti viene usato per la preparazione del Teekwass, prodotto di fermentazione del the. Questa bevanda di uso generale in Russia è considerata come rimedio contro svariatissime malattie e specialmente contro la stipsi abituale<sup>33</sup>). Il microorganismo necessario per la preparazione del Teekwass si chiama fungo del Giappone o della Mancuria, dove ha la sua origine probabile. In Germania è conosciuto in varie località, ma probabilmente è di introduzione straniera. Durante la guerra mondiale il fungo proveniva dalla Russia attraverso la Galizia.

L'*A. xylinum* è uno schizomicete frequente in natura e si trova spesso nelle birrerie e negli acetifici e se ne può quindi facilmente concepire il trasporto per mezzo delle mosche dell'aceto sul the zuccherato esposto all'aria. E' tuttavia difficile ammettere che contemporaneamente avvenga anche l'inquinamento del liquido con lo speciale lievito necessario a questa fermentazione. E' più facile ammettere che l'associazione batterica primitiva, avvenuta casualmente, sia poi stata scientemente coltivata e preparata, come ad es. avvenne per il Kefir. Per la preparazione del Teekwass è necessario il trasporto di una piccola porzione di massa gelatinosa su the freddo zuccherato contenentuna fetta di limone. Il lievito, presente nella membrana gelatinosa, è necessario per la fermentazione dello zucchero in alcool, dal quale avviene l'ulteriore acidificazione per mezzo dell'*A. xylinum*. L'acidità data dal limone serve ad impedire l'inquinamento del liquido con germi estranei alla fermentazione. Henneberg ha preparato in modo analogo surrogati del Teekwass partendo da infusi di foglie di fragola, di more, di fiori di tiglio, ecc. Spesso la fer-

mentazione è disturbata dal *Citromyces*, lieviti a pettine, *Torulopsis*, *A. ascendens*, ecc.

Henneberg per la preparazione del Teekwass raccomanda di partire da colture pure di *Schizosaccaromyces Pombe* <sup>1)</sup> e di *A. xylinum*.

3) Rammentiamo infine a titolo di curiosità, un brevetto americano (U.S.A.) che riguarda la formazione di un surrogato del cuoio tannando membrane date da muffe o da batteri <sup>34</sup>). Queste sono formate da *A. xylinum*, *A. xylinoides*, e da *Mucor Boidin*, quando vengano coltivate su mezzi adatti.

Il terreno suggerito è mosto di birra contenente una metà di alcool all'1 %. La forma e la grandezza del recipiente determina la forma e la grandezza del prodotto finale. Lo spessore della membrana è determinato dalla durata dello sviluppo della coltura.

Per aumentare la resistenza e la densità della membrana si possono aggiungere fibre tessili o polvere di sughero e le membrane stesse venire compresse come prima della tannatura. Si possono impiegare saponi di resina come riempitivo e grassi ed olii per ammorbidire la membrana.

Finito l'accrescimento della membrana, si tratta con un debole liscivio o una soluzione 5 % del solfito di sodio e poi si tanna come il cuoio con tannino, con allume o cromo, tutto questo secondo il brevetto americano, sul valore del quale non possiamo assumere alcuna responsabilità.

In Germania durante l'ultima guerra si cercò di utilizzare con qualche risultato, le membrane di xilino come surrogato del cuoio (Glaubitz).

\*\*\*

Noi abbiamo iniziato le nostre esperienze prelevando il materiale da una bottiglia di aceto inquinata con *A. xylinum*. Come già abbiamo detto altrove, spesso questa specie si sviluppa in bottiglie di aceto durante il periodo di deposito, formando tenaci membrane cilindriche a forma di candele, che partendo dal tappo raggiungono il fondo della bottiglia.

Alcuni frammenti di questa membrana gelatinosa furono trapiantati in palloncini contenenti estratto di lievito, (estratto che si ottiene trattando per 2-3 ore a vapore fluente una parte di lievito da fornoia addizionata a 10 parti di acqua, filtrato a caldo dopo aggiunta di bolus alba). Al lievito vennero addizionati rispettivamente levuloso e glucoso al 3 %. Le colture rimasero in termostato a 28°. I primi 2-3 giorni si osserva un vivace sviluppo di anidride carbonica e dopo alcuni giorni comincia la formazione delle caratteristiche membrane dell'*A. xylinum*. Spinta la prima membrana nel liquido con un ago di platino se ne forma una seconda, una terza e così via. Lasciate le membrane alla superficie del liquido queste vanno man mano ispessendosi. Alcune volte non si osserva sviluppo di gas e in questi casi la formazione delle membrane è anche più rapida e pare che si formino quantità minori di acido acetico.

Si ottennero colture pure del batterio facendo successive diluizioni in liquidi.

Incidentalmente furono fatte anche fermentazioni partendo da estrat-

---

<sup>1)</sup> *Pomba*: è una bevanda preparata dai negri dell'Africa, da miglio germinato.

to di lievito addizionato a glicerina (4%) e allestendo controlli con solo estratto di lievito. Si osservò sviluppo di membrane a partire dal terzo giorno, mentre nei controlli non si osservò nessun sviluppo.

Fin dall'inizio delle nostre ricerche ci siamo voluti accertare della natura delle membrane sviluppatesi dal levuloso e dal glucosio. A questo scopo le membrane venivano trattate nel modo seguente: si lavavano abbondantemente con acqua per allontanare il liquido di nutrizione e si bollivano per 2 ore con una soluzione di idrato sodico al 2%. Si sciacquavano in acqua e si bollivano rinnovando 2-3 volte il solvente. Infine si immergevano in acqua acidulata con acido acetico lasciando pernottare. Si facevano nuovamente bollire rinnovando l'acqua 2-3 volte. Le membrane venivano allora asciugate comprimendole fra carta da filtro e poste sotto pressione fino a completo essiccamento. Esse si presentavano come foglietti di pergamena sottili, trasparenti, resistentissimi alla trazione.

Queste membrane danno la tipica colorazione della cellulosa con cloro-ioduro di zinco e si tingono intensamente coi colori sostantivi (rosso Congo). Si colorano con bleu di metilene e rimangono scolorate con eosina e con verde acido.

È nota l'influenza dei metalli alcalini e alcalino-terrosi sullo sviluppo dei batteri e dei funghi (lieviti compresi). Alcuni metalli (ferro, manganese, zinco) aggiunti in lievissime tracce pare abbiano importanza sullo sviluppo batterico<sup>35</sup>). Anche l'alluminio, il nichel ed il cobalto eserciterebbero un'azione stimolante sulle muffe.

Noi abbiamo voluto intraprendere alcune ricerche sull'azione catalitica dei metalli giovandoci di un dispositivo in uso fra i vecchi botanici. In una serie di bevute col liquido culturale sopra indicato si immerse lamina dei metalli seguenti: rame, alluminio, zinco, nichel e ferro (acciaio resistente).

Esaminando le colture dal terzo giorno in poi si osservò la solita formazione di zolle superficiali confluenti in seguito in membrane gelatinose. Lo sviluppo avvenne regolare e uguale in tutte le bevute. Dopo una diecina di giorni si constatò un'azione stimolante evidentissima nelle bevute contenente rame, la membrana sviluppata aveva uno spessore 4-5 volte maggiore delle altre, mentre nelle rimanenti bevute lo sviluppo rimase regolare senza presentare differenze notevoli. Le lamine di rame e di zinco apparivano intaccate nella parte immersa nel liquido, meno il nichel e affatto l'alluminio ed il ferro. Forse il cambiamento di reazione del liquido, dopo qualche giorno, in seguito allo sviluppo di acido acetico, è causa della solubilizzazione del metallo e quindi della sua azione stimolante. Si volle provocare l'azione catalitica del rame partendo dal suo solfato e facendo aggiunte di questo sale da 0,01-0,0001%. Anche qui l'azione stimolante del catione fu evidentissima.

Era scopo delle nostre ricerche la produzione in grande stile di membrane batteriche e si cercò quindi di coltivarle su terreni inorganici con zuccheri tecnici. Dopo aver provato con esito negativo alcuni terreni minerali liquidi (Wehmer, ecc.) ci siamo arrestati al liquido di Henneberg<sup>36</sup>) per la coltura di bacilli acetificanti della seguente composizione:

solfato ammonico 0,3 %, fosfato potassico monobasico 0,3 %, solfato di magnesio 0,2 %, alcool etilico 2 %, zuccheri 2 %, acqua distillata.

Dapprima questi liquidi vennero addizionati con zuccheri puri (glucoso, levuloso) e poi con zuccheri tecnici (glucoso tecnico C. Erba e glucoso liquido a 45 Bè). Lo sviluppo delle membrane appare più rigoglioso su questi terreni di Henneberg che non su estratto di lievito ed è migliore con glucoso che con levuloso, contrariamente a quanto avviene con estratto di lievito addizionato con gli stessi zuccheri. L'aggiunta di alcool è importante poichè nei controlli che non lo contengono non si ha sviluppo o sviluppo tardivo di membrane.

Si allestirono con questo terreno esperienze in grande in bacinelle di vetro (15 × 25 × 35), chiuse con una lastra di vetro e in poche settimane si ottennero membrane che raggiungevano metà dell'altezza del liquido. Allontanate si formavano nuove membrane che praticamente esaurivano tutto il liquido presente.

Fu studiata l'influenza di una rapida ossigenazione, facendo giornalmente passare una corrente di ossigeno nei liquidi di coltura. Non si osservò alcuna differenza tra questi liquidi ossigenati e i controlli, in cui l'aria si rinnovava difficilmente attraverso la chiusura del recipiente. Anzi in esperienze intraprese con altro scopo, in cui si ossigenava giornalmente il liquido tenuto in movimento, si osservò molto sviluppo di acido acetico e minore sviluppo di membrane.

Nelle colture fatte su liquido di Henneberg non fu osservata l'azione stimolante dei sali di rame come si era verificato negli estratti di lievito.

Venne anche osservata l'azione dell'*A. xylinum* sulle fibre tessili e sulle paste cellulosiche per carte, per studiare l'eventuale applicazione della cellulosa prodottasi, quale mezzo adesivo tra le bave elementari dei filati e le fibre delle carte, e le variazioni sulle loro caratteristiche dinamiche.

Come fibre tessili utilizzammo un raion viscosa multibave (100 den. 40 bave) avvolto su di un telaino, che veniva alternativamente immerso ed estratto dal liquido di coltura inquinato con *A. xylinum*. Effettivamente sulla superficie del filato si formarono delle pellicole di cellulosa, la quale però non penetrando tra le singole bave elementari, e non essendo uniformemente distribuita, non esercitò nessun potere collante, nè determinò variazioni nella resistenza dei filati.

Per lo studio delle paste cellulosiche si partì da una sospensione di fibre di abete al solfito in liquido colturale, contenuto in un grosso recipiente cilindrico di vetro ruotante intorno all'asse, per impedire la formazione di pellicole superficiali, e permettere alla cellulosa prodotta dall'*A. xylinum* di assumere una forma dispersa e depositata sulle singole fibre. Il liquido veniva di tanto in tanto ossigenato, durante l'esperimento della durata complessiva di 15 giorni. Anche in questo caso l'esame microscopico delle fibre, mostrò la formazione sulla loro superficie di pellicole irregolari di cellulosa.

Con la pasta così trattata, vennero preparati dei fogli secondo le norme adottate per gli esami delle cellulose per usi cartari, e vennero determinate le lunghezze di rottura, resistenza alle pieghe, ecc. in con-

fronto ad altri fogli preparati con la medesima pasta, non sottoposta al trattamento di cui sopra. I risultati furono praticamente uguali, per modo che, almeno secondo questa prima serie di esperienze, anche in questo caso l'azione dell'*A. xylinum*, non si è dimostrata efficace. Data però la natura muco-gelatinosa della cellulosa prodotta dall'*A. xylinum*, è nostra intenzione di riprendere gli esperimenti, adottando altre condizioni di lavoro.

Oltre le precedenti colture fatte con *A. xylinum* ricavato dall'aceto si sperimentò anche con una associazione batterica proveniente da colture di Teekwas. Senza aver fatto prove quantitative in proposito, pare che le membrane ottenute con queste colture siano altrettanto rigogliose e tenaci che quelle ottenute col solo *A. xylinum*.

La produzione di cellulosa per mezzo dell'*A. xylinum* trova un primo impedimento nel costo della materia prima impiegata, poichè il prezzo del glucosio, sia pure impiegando preparati tecnici, impedisce qualsiasi sfruttamento industriale del processo. Noi abbiamo iniziate esperienze partendo dal liscivio solfitico, sottoprodotto della fabbricazione della cellulosa ancora oggi in massima parte inutilizzato. Tali esperienze hanno già dato qualche risultato positivo, ma è ancora necessario stabilire molte modalità delle ricerche, perchè i liscivi per molte ragioni non si possono direttamente sfruttare come il glucosio o il melassa.

Per ulteriori accertamenti della natura delle pellicole ottenute con l'*A. xylinum* abbiamo preparato e studiato alcuni esteri della cellulosa così ottenuta e riassumiamo qui sommariamente queste nostre ricerche.

*Nitrificazione.* — Fogli molto sottili di cellulosa di xilino del peso di 2 gr. circa vennero posti nella seguente miscela nitrante:

acido solforico	61,7%
acido nitrico	20,7%
acqua	17,6%

e mantenuti per 24 ore alla temperatura di 16°. Il prodotto separato dall'eccesso di miscela nitrante, venne lavato a fondo alternativamente con acqua calda e fredda e quindi seccato in stufa a 40°.

Da gr. 1,9885 di cellulosa di xilino si ottennero gr. 3,0316 di nitrocellulosa con un contenuto dell'11,61 % di azoto. La nitrocellulosa risultò solubile in acetone e non dissimile per le altre proprietà fisiche da quella ottenuta partendo dal cotone.

*Acetilazione.* — Venne eseguita aggiungendo a piccole porzioni 30 gr. di cellulosa di xilino finemente polverizzata a 300 gr. della miscela seguente, addizionata a 7 gr. di acido solforico a 95° e previamente raffreddata a 3°:

anidride acetica	parti 35
acido acetico	» 65

Dopo aver ben mescolata la massa venne innalzata gradatamente la temperatura in modo da arrivare durante 6 ore a 25°, mantenendo tale temperatura fino a completa acetilazione ossia fino ad ottenere uno sciroppo limpido e vischioso, privo di particelle non acetilate.

La massa ottenuta venne colata in filo sottile entro un bicchiere con-

tenente acqua distillata fredda, agitando continuamente per impedire la formazione di grumi. Si filtrò e si lavò ripetutamente con acqua bollente fino a neutralità completa.

L'acetato così ottenuto corrispose come composizione e come solubilità nei vari solventi, ad un normale triacetato di cellulosa.

*Viscosa.* — Il trattamento da noi usato per la preparazione dello xantogenato di cellulosa è stato il seguente: mercerizzazione eseguita con idrato di sodio a 18 %, alla temperatura di 18° circa durante 5 ore; allontanamento dell'eccesso di soda caustica con la spremitura e maturazione dell'alcalicellulosa, per 48 ore circa a 28°; sul prodotto si fece agire solfuro di carbonio in ragione del 20-25 %, calcolato sul peso della cellulosa di partenza, alla temperatura di 20-25° per alcune ore. Si ottenne così lo xantogenato di cellulosa che si sciolse in soda caustica al 3 % scuotendo energicamente fino a soluzione completa.

Con tale prodotto di colore arancio scuro e assai vischioso, del tutto simile alla normale « viscosa » dell'industria, si ottennero per evaporazione e successiva decomposizione dello xantogenato con bagni acidi, pellicole trasparenti di cellulosa rigenerata. Fu anche possibile ottenere, mediante i noti processi di filatura, dei crini partendo da filiere ad un solo foro di grosso diametro, mentre non fu possibile ottenere del vero rayon per impossibilità pratica di filtrare la viscosa.

Questa difficoltà si riconnette alla natura non fibrosa delle pellicole di xilino che non permettono una penetrazione uniforme dei reattivi. Quindi specie nella fase di xantogenazione, sia per la non omogenea composizione dell'alcali cellulosa nei diversi strati del materiale trattato, sia per la natura colloidale gelatinosa dei prodotti della reazione, rimangono delle pellicole non completamente solforate di difficilissimo allontanamento per filtrazione, data la loro natura mucilaginosa.

Per questo motivo, applicando tale procedimento direttamente alla cellulosa di xilino anche se ottenuta in fogli sottili e tagliata in piccoli frammenti, si incontrò difficoltà per ottenere una mercerizzazione completa. Malgrado il rigonfiamento notevole della cellulosa non si verificò la soluzione completa dello xantogenato ottenuto con tale alcalicellulosa. Migliori risultati si ebbero macinando il più finemente possibile la cellulosa di xilino e prolungando il tempo di mercerizzazione e di maturazione. Malgrado questi accorgimenti non si ottenne, come si è detto una viscosa filtrabile. Non abbiamo insistito in queste nostre esperienze perchè non avevamo a nostra disposizione uno strumentario adatto per la disgregazione della cellulosa, ed abbiamo quindi rinunciato a riportare dati quantitativi, riserbandoci di tornare con maggiori mezzi sullo studio dei derivati della cellulosa di xilino.

*Viscosità.* — La cellulosa di xilino si scioglie egregiamente in soluzione cuproammoniacale (reattivo di Schweizer) dando luogo a soluzioni altamente vischiose. Dalle misure viscosimetriche, eseguite con soluzioni diluite di cellulosa da *A. xylinum* preventivamente trattata con soluzione di soda per allontanare le sostanze proteiche, abbiamo potuto calcolare un grado di polimerizzazione intorno a 1600, dal quale si deduce un peso molecolare di circa 260.000.

*Dinamometria.* — Sopra fogli di cellulosa di xilino furono fatte prove dinamometriche servendoci del comune strumentario con cui si eseguiscano tali saggi sulla carta. Riproduciamo dati medi desunti da prove eseguite sopra 7 diversi fogli di cellulosa:

Grammatura <i>media</i>	gr./mq. 100
Lunghezza di rottura <i>media</i>	mt. 11.400
Allungamento <i>medio</i>	4%
Doppie pieghe (trazione di morsetti gr. 1000)	14.460
Scoppio (Muller-Testir) superiore a	8 kg./cm <sup>2</sup>
Strappo (Elmendorf)	0

Osserviamo che malgrado i dati non estremamente elevati di lunghezza di rottura *media* abbiamo spesso notato dei valori massimi molto superiori (16-17000).

Pertanto è probabile che la resistenza specifica alla rottura della cellulosa di xilino sia in realtà assai superiore a quella da noi riportata come *media*. Questo fatto d'altronde risulta confermato dalla resistenza allo scoppio superiore agli 8 kg. per cm<sup>2</sup> e che purtroppo non abbiamo potuto determinare per mancanza di apparecchio adatto.

Avendo sperimentato su striscie ricavate da fogli ottenuti in bacinelle rettangolari, e quindi di tale formato, abbiamo constatato una maggiore resistenza nel senso della lunghezza rispetto alle striscie ritagliate nel senso della larghezza del foglio. Non sappiamo veramente spiegare questo fatto, che come noto, si riscontra nella carta fatta a macchina ove l'orientamento che assumono le fibre cellulosiche produce appunto una maggiore resistenza nel senso della lunghezza. Nel nostro caso trattandosi di cellulosa non fibrosa e prodotta da germi uniformemente distribuiti nella massa, non dovrebbero notarsi direzioni privilegiate: comunque abbiamo in programma altre esperienze servendoci di bacinelle rotonde o quadre per verificare il fenomeno.

La cellulosa di xilino, o meglio, le pellicole di cellulosa di xilino non fanno rotare il piano della luce polarizzata, confermando così che le macromolecole cellulosiche non presentano nelle pellicole stesse alcun orientamento.

A confronto dei dati dinamometrici surriferiti riproduciamo alcuni dati di cellulosa di pino per kraft di ottima qualità a 35° (Schopper-Riegler) di raffinazione.

Lunghezza di rottura	12.000-13.000
Allungamento	5-6 %
Scoppio	6-8 kg./cm <sup>2</sup>
Doppie pieghe	4-6000
Strappo (Elmendorf)	170-200

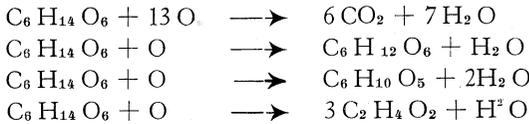
L'unico contributo importante sul metabolismo dell'*A. xylinum* è quello arrecato da Mme Khuvine con i lavori ai quali abbiamo accennato.

Le esperienze della Khuvine vennero fatte con acqua di lievito al 5 % circa addizionata agli alcoolici da studiare, nella proporzione del 3 %. Per ogni esperienza la Khuvine allestì tre colture, di cui una su sola acqua di lievito, oltre una prova in bianco. Nelle colture fatte su

acqua di lievito il peso della membrana di 25-45 giorni era appena di 2-4 mgr., il metabolismo trascurabile, e gli scambi gassosi minimi.

Rimandiamo a quanto abbiamo già detto circa le modalità delle esperienze e di metodi di analisi, aggiungendo solo alcuni chiarimenti. Le analisi di gas furono fatte su campioni di 100 cc. nei quali si dosò l'ossigeno e l'anidride carbonica e, dall'aumento dell'azoto, si dedusse la quantità di aria consumata. Il dosaggio del carbonio fu fatto con un metodo semi-microanalitico (Ter Meulen) sull'estratto secco del controllo e delle colture e sulla membrana bruta: per gli altri composti i dati furono ottenuti col calcolo. Dal peso della membrana bruta si dedusse il 10,8 % corrispondente alle proteine batteriche e si ottenne così il peso della cellulosa sintetizzata dall'*A. xylinum*.

Nella tabella I sono riportate, dai lavori suddetti della Khouvine, le quantità di composti formati nella fermentazione degli alcoli. Dai pesi dell'anidride carbonica, zucchero, cellulose ed acidi della tabella l'autrice risalì con semplici calcoli stechiometrici alla quantità corrispondente dell'alcool consumato, ottenendo i risultati riassunti nella tabella II. I calcoli furono impostati supponendo vere le seguenti equazioni per gli alcoli a 6 atomi di carbonio.



Nel calcolo della cellulosa fu dedotto dal peso della membrana bruta il 10,8 % di cui si è detto sopra.

TABELLA I.

		1 O <sub>2</sub> residuo %	2 O <sub>2</sub> consumato mg.	3 CO <sub>2</sub> mg.	4 Zucchero mg.	5 Membrana bruta mg.	6 pH	7 Acido mg.	8 Alcool mg.
Eritrite	21 g.	10.75	622	260	3895	106	—	119	—
Eritrite	30 »	10.16	731	270	4384	102	—	243	30
Mannite	11 »	18.98	135	65	618	150	6.9	6	—
Mannite	15 »	11.87	727	412	2777	760	6.0	23	—
Mannite	21 »	3.40	1276	1056	3357	11.0	4.5	48	9
Sorbite	11 »	20.18	44	10	366	17	7.2	—	—
Sorbite	15 »	18.15	190	65	1530	50	6.8	15	—
Sorbite	21 »	10.20	715	358	5649	100	6.5	35	17
Dulcite	30 »	11.47	603	734	352	100	—	78	30

I dati delle tabelle precedenti ci fanno vedere tra l'altro:

a) che praticamente nei bilanci si trova tutto il carbonio messo in opera.

b) che per colture di 21 giorni (tabella II, colonna 4) la sorbite è tutta ossidata, mentre rimangono inalterati gr. 0,647 (6000-5326) di mannite,

TABELLA II.

		1 CO <sub>2</sub> mg.	2 Zucchero mg.	3 Cellulosa mg.	4 Acido mg.	5 Totale mg.
Tritrite	21 g.	120	3933	144	—	4197
Eritrite	30 »	152	4427	138	6	4717
Mannite	11 »	45	624	156	6	831
Mannite	15 »	284	2807	762	23	3876
Mannite	21 »	727	3404	1152	43	5326
Sorbite	11 »	6	370	16	—	392
Sorbite	15 »	44	1547	45	12	1648
Sorbite	21 »	246	5706	99	34	6085
Dulcite	30 »	500	355	99	77	1031

TABELLA III.

		1 CO <sub>2</sub> mg.	2 Peso secco mg.	3 Membrana mg.	4 Acido mg.	5 Alcool mg.	6 Carbone totale trovato mg.	7 Carbone totale del controllo mg.
Eritrite	21 g.	78	2509	50	48	5	2690	2754
Mannite	11 »	17	2574	75	5	—	2668	2750
Mannite	15 »	112	2329	384	9	—	2834	2713
Mannite	21 »	287	1931	517	17	4	2756	2770
Sorbite	11 »	2	2709	8	—	—	2719	2761
Sorbite	15 »	12	2720	20	5	—	2757	2761
Sorbite	21 »	97	2471	45	13	10	2635	2698

TABELLA IV.

		1 CO <sub>2</sub> Alcool %	2 Zucchero Alcool %	3 Cellul. Alcool %	4 Alcool brucc. Zucchero %	5 Alcool brucc. Cellul. %	6 CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub> trovato mg.	7 CO <sub>2</sub> O <sub>2</sub> teorico mg.
Eritrite	21 g.	4.33	65	2.40	0.03	1.26	0.41	1.22
Eritrite	30 »	4.50	73	2.30	0.03	1.66	0.36	
Mannite	11 »	1.08	10.30	2.6	0.07	0.36	0.48	
Mannite	21 »	6.86	46.28	12.7	0.10	0.41	0.56	
Mannite	21 »	17.6	55.95	19.2	0.21	1.00	0.82	
Sorbite	11 »	0.15	6.10	0.26	0.01	0.64	0.22	
Sorbite	15 »	1.08	25.5	0.75	0.02	1.00	0.34	
Sorbite	21 »	5.96	94.15	1.65	0.04	2.79	0.50	
Dulcite	30 »	12.23	5.86	1.65	1.41	5.08	1.21	

Nella tabella III sono riferiti i bilanci del carbonio ottenuto in parte direttamente e in parte calcolati. Nella tabella IV sono date le quantità di alcool bruciato per mgr. di zucchero e di cellulosa e i rapporti CO<sub>2</sub> : O<sub>2</sub> confrontati coi rapporti teorici della combustione degli acoli.

1 gr. circa di entnte, e 5 gr. di dulcite: per quest'ultimo zucchero la fermentazione non è terminata neanche in 30 giorni.

c) che l'*A. xylinum* (tabella II, colonna A) ossida gli alcoli a CO<sub>2</sub> secondo la scala decrescente:

mannite > dulcite > sorbite > eritrite. Partendo dalla mannite si ha un migliore rendimento i cellulosa e partendo dalla sorbite un migliore rendimento in zucchero;

d) che i rendimenti in cellulosa rispetto all'alcool ossidato a CO<sub>2</sub> decescono secondo la serie:

mannite > eritrite > sorbite > dulcite

come si ricava confrontando la colonna 5 della tabella IV con la colonna 3 della tabella H;

e) che nella sintesi della cellulosa l'*A. xylinum* utilizza talvolta meglio un alcool a 4 atomi di carbonio (eritrite) ch altri a 6 (ad es. dulcite e sorbite). Questo risultato completamente inatteso fa pensare che le grandi molecole si scindano e che la sintesi della cellulosa si faccia per condensazione di molecole a piccolo peso molecolare.

Considerando la tabella I vediamo che per l'eritrite, la sorbite e la dulcite, l'ossigeno residuo è almeno del 10 %, mentre per la mannite è del 3.4 %. Ciò dimostra che l'*A. xylinum* utilizza l'ossigeno anche a basse pressioni. Ci si può domandare se la fermentazione in queste condizioni di anaerobiosi parziale avvenga allo stesso modo che nella aerobiosi. Per risolvere questo quesito la Khouvine rifece le sue esperienze partendo da 9 gr. di zucchero in 100 cc. di liquido in recipienti da 5 litri e raddoppiando così la quantità dell'aria. L'autrice estese queste esperienze alla glicerina e ad altri zuccheri (arabite, eptite), e trovò che interessantissimi sono i notevoli rendimenti in cellulosa dati dalla fermentazione della glicerina. Confrontando i dati ottenuti da questa seconda serie di esperienze con quelli della prima serie da noi riferiti, si trova che le variazioni fra un alcool e un altro procedono nello stesso senso nelle due esperienze, però i rapporti alcool bruciato: cellulosa e alcool bruciato: zucchero, per la mannite sono più elevati in presenza di un eccesso di ossigeno. Dopo un certo tempo l'*A. xylinum* sciupa molto alcool in aerobiosi, per modo che le colture di mannite diventano parzialmente anaerobiotiche. Ciò dimostra che l'energia di respirazione non è indispensabile alla sintesi.

Mme Khouvine, nelle sue conclusioni, si domanda come avvenga la sintesi della cellulosa dalla fermentazione degli alcoli da lei studiati. Se le equazioni precedentemente riportate corrispondono alla realtà, dice l'autrice, la cellulosa si formerebbe per reazione spontanea e l'energia necessaria per la sintesi sarebbe data da quella che si libera dalla scissione degli alcoli polivalenti in corpi intermedi. Se la cellulosa al contrario si forma per sdoppiamento di grosse molecole l'energia liberata in questa reazione è verosimilmente sufficiente per la sintesi.

A noi pare che il problema sia assai più complesso, tutt'ora lontano da una soluzione, e a conferma delle nostre vedute vogliamo qui riportare le parole con le quali Mario Michels<sup>37)</sup> abordava l'argomento. «È «forse improprio il voler considerare la sintesi della cellulosa per mezzo

«dell'*Acetobacter xylinum* come una sintesi chimica di laboratorio, dato «che intervengono fenomeni il cui meccanismo ancora ci sfugge e che «dobbiamo ritenere altrettanto misterioso quanto quello della formazione «della cellulosa nei vegetali. Con lo stesso diritto col quale si parlerebbe, «nel caso precedente, della sintesi della cellulosa, si potrebbe parlare di «una sintesi proteinica dallo stesso glucosio poichè si sono pure trovati «certi microorganismi nel lievito, che sono capaci di fissare l'azoto dell'aria, come i batteri nitrificanti, e danno, a partire dal glucosio, un'ottima «resa in proteine. Così pure la «sintesi della cellulosa» a partire dalla «glicerina, secondo la Signora Y. Khouvine, non ci autorizzerebbe a considerare la cellulosa come un prodotto di polimerizzazione della glicerina».

Il quesito ci pare del più alto interesse e varrebbe la pena di riprendere le ricerche della Khouvine in condizioni sperimentali diverse e di estenderle ad altri composti: alcoli polivalenti, zuccheri, alcoli semplici, per cercare di meglio chiarire il metabolismo batterico e la sintesi della cellulosa.

Abbiamo in corso ricerche sul ricambio degli zuccheri in presenza dell'*A. xylinum*, che a suo luogo comunicheremo e che speriamo porteranno qualche contributo ad un problema per ora tutt'altro che chiaro.

#### RIASSUNTO

Si espongono con qualche ampiezza le proprietà dei batteri acetificanti e le loro applicazioni alla fermentologia, trattando specialmente dei batteri formanti membrane e dell'*A. xylinum* che fa oggetto delle presenti ricerche. Riferiti gli ultimi studi della Khouvine sull'argomento si espongono le esperienze personali riguardanti specialmente gli accertamenti sulla natura cellulosica delle membrane formate dall'*A. xylinum* in presenza di soluzioni zuccherine. L'accertamento di tale cellulosa venne fatto in base a derivati della cellulosa stessa (acetilcellulosa, nitrocellulosa e viscosa).

Sono poi state determinate le proprietà dinamometriche e viscosimetriche di fogli di cellulosa così ottenuti. Si accenna infine a qualche applicazione di queste membrane e alla possibilità di ottenerle partendo da materiali a buon mercato.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Der Verfasser berichtet über die charakteristischen Eigenschaften von Essigbakterien und über ihre gärungstechnischen Anwendungen, mit besonderer Berücksichtigung der membranbildenden Bakterien und des *A. xylinum*. Der Verfasser teilt weiter die letzten Arbeiten von Khouvine mit und hebt eigene Untersuchungen hervor über die zellulose Natur von *A. xylinum*-Häutchen aus den Lösungen von Kohlenhydraten. Dieser Zellstoff wurde hauptsächlich auf Grund von Derivaten der Zellulose (Acetyl-nitrocellulose und Viscoser bestimmt).

Die dynamometrischen und viscosimetrischen Eigenschaften von Zell-

stoffblättern aus *A. xylinum* wurden eingehend untersucht. Schliesslich weist der Verfasser auf die Anwendungen von solchen Membranen hin und auf die Möglichkeit diese aus billigerem Ausgangsmaterial zu erhalten.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) *Desfosses* - J. Pharm. et Chim. 15 (1829).
- (2) *G. De Rossi* - Microbiologia agraria e tecnica U.T.E.T., Torino, 1921-26, pag. 420 e seg.  
*E. Duclaux* - Traité de microbiologie, 4 vol. Masson, Paris, 1898-1901, vol. IV, pag. 391 e seg.
- (3) *W. Beneke* - Bau und Leben der Bakterien, Teubner, Leipzig, 1912, pag. 59.
- (4) *F. Lafar* - Handbuch d. Technischen Mykologie, 5 vol., Fischer, Jena, 1904-15.  
*W. Kruse* - Allegemeine Mikrobiologie. Vogel, Leipzig, 1910, pagina 404 e seg.  
*W. Benecke* - l. c., pag. 90 e seg.
- (5) *Beijerinck* - Fol. microbiologica I, 1912.
- (6) *Harrison, Tarr e Hibbert* - Can. J. Res. 4 (1930).
- (7) *A. C. Thaysen e L. D. Galloway* - The microbiology of Starch and Sugars. Oxford University Press. 1936, pag. 172 e seg.  
*A. G. Norman* - The biochemistry of Cellulose, polyuronidy, lignin, etc. Oxford, Clarendon Press. 1937, pag. 197 e seg.
- (8) *Spanedda* - Giorn. di batt. e Imm. XX (1938), pag. 78.
- (9) Sommariamente in: *Tollens* - Elsner. Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate, IV Ed., Barth. Leipzig, 1935, pag. 606.
- (10) *W. Cremer* - Be. 32 (1891).
- (11) *W. Henneberg* - Chem. Centralb. 73 (1902).
- (12) *Turpin* - Mémoire sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acétique. C. R. Ac. Sc. 1938.  
*Kützing* - Mikrosk. Untersuchungen über die Hefe und Essigmutter. Journal f. prakt., Chemie (1837).
- (13) *Pasteur* - Mémoire sur la fermentation acétique. Annales scientifiques de l'Ecole Normale Supérieure (1864).  
*Pasteur* - Etudes sur le vinaigre. (1868).
- (14) *Duclaux* - Traité de Microbiologie. Vol. IV, pag. 204 e seg.  
*E. Duclaux*: Pasteur. Histoire d'un esprit. Masson, Paris, 1896, pagg. 69-109.  
Per la teoria di *Liebig*: Ann. Chem. 30 (1939) e *J. Liebig*: Lettres sur la Chimie. 2 vol., Baillière, Paris, 1845-52. Lettere XVI-XXVIII.
- (15) *Beijerinck* - Über die Arten der Essigbakterien. Centralbt. f. bakt. II Abt. 4 (1898).
- (16) *Henneberg* - Beiträge zur Kenntnis der Essigbakterien. Centralbt. f. Bakt. II Abt. 3 (1897) 4 (1898).

- Henneberg* - Zur Unterscheidung der Essigbakterien, Zeitschr. f. Essigindustrie (1898).
- (17) *A. Jörgesen* - Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie, 6 Aufl. von A. Hansen und A. Lund. Fischer, Jena, 1940.
- (18) *Wisserx't Hoff* - Inaug. Dissertation. Deft., 1925.
- (19) *Bergey* - Manual of determinative bacteriology. V Ed. Baillièrè, Tindal e Cox. London, 1939, pag. 231.
- (20) *A. Jörgesen*, l. c.
- (21) *Henneberg W.* - Handbuch der Gärungsbakteriologie. II Ed. 2 vol. Parey, Berlin, 1926, vol. II, pag. 239.
- (22) *Bernhauer K.* - Gärungsschemisches Practicum. II. Ed. Springer, Berlin, 1939.
- Bernhauer K.* - Oxydative Gärungen in Nord-Weidenhagen. Handbuch der Enzymologie, 2 vol. Akad. Verlag. Leipzig, 1940, vol. II, pag. 1035 e seg.
- (23) *A. J. Brown* - On anacetic ferment which forms cellulose. J. Chem. Soc. 49 (1866). Be. d. Chem. Ges. 19 (1887)
- (24) *G. Bertrand* - Préparation biochimique du sorbose. C. R. Acc. Sc. 122 (1896).
- Etude biochimique de la bactérie du sorbose. Ann. Chim. et Phys. 3 (1904), 8° série.
- (25) *Vincent e Delachanel* - C. R. Acc. Sc. 125 (1897).
- (26) *G. Bertrand* - C. R. Acc. Sc. 128 (1898).
- (27) *Y. Khouvine* - C. R. Acc. Sc. 196 (1933); 198 (1934).
- Y. Khouvine* - Cellulose bactéries - Décomposition et Synthèse. Hermann, Paris, 1934.
- (28) *Y. Khouvine* - G. Carpentier e R. Sustra. C. R. de l'Acc. d. Sc. 1932 (134).
- (29) *Beijerinck* - Centralb. f. Bakt. II Teil. 1898.
- Emmerling* - Be. d. Chem. Ges. 1899.
- (30) *H. Hibbert e f. Barsha* - J. Am. Chem. Soc. 53 (1931).
- (31) *R. Sutra* - Etude sur la cellulose du *B. xylinum*. C. R. Acc. Sc. 95 (1932).
- (32) *W. Henneberg* - l. c. vol. II, pag. 190 e seg.
- (33) *W. Henneberg* - l. c. pagg. 225 e 379 e seg.
- (34) *R. O. Herzog e Mayer* - Leather substitute U. S. patent 1.141.545 (1915) citato da H. Smith e W. Obold: Industrial microbiology, pag. 133.
- (35) *G. De Rossi* - l. c. pag. 138 e seg.
- Smith e Obold* - l. c.
- (36) *W. Henneberg* - l. c. vol. I, pag. 51
- (37) *M. Michels* - Teorica della cellulosa. Paravia, Torino, 1939.

---

Direttore responsabile: Prof CARLO ARNAUDI

I.G.I. - Industria Grafica Italiana S. A. - Milano, Via M. Melloni 17 - Tel.21035