

ANNALI DI MICROBIOLOGIA

RACCOLTA DI MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA
ALL'AGRICOLTURA, ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI

A CURA DEI PROFESSORI:

T. CASTELLI PERUGIA - V. PEGLION BOLOGNA - B. PEYRONEL TORINO
S. RICCARDO NAPOLI - M. SACCHETTI BOLOGNA - O. VERONA FIRENZE

DIRETTA DA

C. ARNAUDI MILANO

AGOSTO 1940 - XVIII
VOL. I - FASC. I

ORGANO DELLA STAZIONE SPERIMENTALE
DI BATTERIOLOGIA AGRARIA DI CREMA

DIREZIONE ED AMMINISTRAZIONE: MILANO VIA CELORIA 2

NORME DI COLLABORAZIONE

Si accettano memorie originali italiane e straniere, purchè scritte in caratteri latini e dattilografate. Esse devono essere perfettamente corrette anche nella punteggiatura.

In ottemperanza alle disposizioni del Consiglio Nazionale delle Ricerche ogni articolo deve essere corredato da un breve riassunto (non più di dieci linee) in italiano. Lo stesso deve essere pure riportato in inglese o tedesco. Se l'Autore non ne fa l'invio in una delle due lingue verrà provveduto d'ufficio alla traduzione e la spesa relativa verrà addebitata ai signori autori.

Agli Autori dei lavori originali vengono concesse non più di 16 pagine di stampa; il numero di pagine in più sarà a carico dell'Autore al puro costo di stampa. Le modificazioni tipografiche che non siano semplici correzioni di errori di composizione saranno addebitate agli Autori a prezzo di costo.

I clichés, le tabelle e le tavole fuori testo sono a carico degli Autori.

Per ogni lavoro verranno concessi 50 estratti gratuiti; per un maggior numero gli Autori dovranno accordarsi direttamente con la Tipografia.

Per la bibliografia si prega di attenersi alle seguenti norme:

a) La bibliografia, col relativo numero di riferimento, deve essere scritta alla fine del lavoro; b) I numeri di riferimento bibliografico nel testo devono essere scritti tra parentesi; c) Le citazioni devono essere fatte nel seguente ordine: 1° Nome dell'Autore; 2° Titolo del lavoro; 3° Titolo del giornale abbreviato; 4° Anno; 5° Volume (in numero arabo, sottolineato); 6° N° delle pagine.

Il numero di chiamata nel testo di eventuali note a piè di pagina deve essere scritto in alto piccolo e con una parentesi di chiusura.

Per i numeri decimali adoperare virgole e mai punti, così nel testo come nelle tabelle.

Adoperare sempre le seguenti abbreviazioni:

Chilogrammo = Kg	metro = m	centim quadr = cmq	minuto se-
ettogrammo = hg	decimetro = dm	millim quadr = mmq	condo = sec
grammo = g	centimetro = cm		per cento = %
decigrammo = dg	millimetro = mm		per mille = ‰
centigrammo = cg	micron = μ	litro = l	normale = N
		centimet.cubo = cc	
milligrammo = mg		ora = h	decimo norm = O, I N
millesimo di			
grammo = y	metro quadr = mq	minuto primo = min	ph, Ph ecc = pH

(tutti questi segni sempre senza punto)

Le formule chimiche devono essere scritte con gli indici in basso. Es. CaCl_2 .

SOMMARIO

C. A. - Presentazione	pag. 1
T. CASTELLI - Ricerche sul Kos albanese	» 3
I. POLITI - I processi di acidificazione dei foraggi insilati	» 15
G. PEPOLI - Ricerche sulla lievitazione panaria	» 33
L. PIAZZA - L'acetil-metil-carbinolo nei foraggi insilati	» 45

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)
ITALIAL. 50 - ESTERO L. 100 - UN FASCICOLO SEPARATO L. 10

PRESENTAZIONE

Gli «*Annali di Microbiologia* » vedono la luce mentre la vita della Nazione è dominata dagli eventi burrascosi che travagliano l'Europa ed il mondo. Sulla opportunità della loro fondazione in questo momento, abbiamo avuto qualche dubbio; la nostra perplessità è stata però fugata totalmente dalle parole del Duce, incitanti gli italiani alla prosecuzione del quotidiano lavoro.

Gli «*Annali di Microbiologia* » non hanno soltanto il compito di contribuire al progresso scientifico, che è pure funzione fondamentale della vita nazionale, ma anche di apportare un contributo più immediato alle attività che tendono al raggiungimento dell'autarchia economica del nostro Paese.

I fenomeni microbiologici hanno tanti rapporti con gli intimi processi che regolano la vita delle piante e presentano tale importanza nella tecnologia delle industrie alimentari e fermentative, che dal progresso degli studi sperimentali in questo campo della biologia, è consentito attendere risultati che rechino non soltanto un contributo di nuove conoscenze scientifiche, ma che portino pure a feconde applicazioni pratiche.

Gli «*Annali di Microbiologia* » raccoglieranno periodicamente le relazioni di questi studi e facendole conoscere ai tecnici dell'agricoltura e delle industrie, potranno assolvere un compito di non scarsa utilità, che è augurabile venga accolto con simpatia dagli interessati.

Nel contempo sarà reso più agevole agli studiosi italiani la pubblicazione dei loro lavori, che per il passato dovevano essere ospitati dalle riviste di batteriologia medica o da quelle di altre materie più o meno affini.

Per gli studiosi non sarà piccolo vantaggio infine, il ritrovare riuniti in un solo periodico i lavori di microbiologia applicata all'agricoltura ed alle industrie. Tale vantaggio sarà tanto maggiore, quanto più i microbiologi italiani, collaborando assiduamente, dimostreranno di condividere il nostro convincimento circa l'utilità di questo periodico, che è anche una espressione del nostro attaccamento alla Scienza che serviamo.

1° Giugno 1940-XVIII.

C. A.

Ricerche sul Kos albanese

Prof. Tommaso Castelli

(Ricevuto il 31 maggio 1940)

Il materiale che gli albanesi indicano col nome di Kos è un prodotto ottenuto dal latte di pecora e preparato aggiungendo al latte fresco ed intero una certa quantità di Kos di una precedente lavorazione e tenuto per un tempo vario a temperatura piuttosto elevata. La tecnica di preparazione si può così riassumere: il latte di pecora fresco ed intero viene fatto bollire per qualche minuto in una pentola metallica indi raffreddato intorno a 45° (1) è aggiunto di una piccola porzione del materiale della lavorazione precedente e versato in recipienti di terracotta internamente verniciati. I recipienti, di forma larga e bassa (vedi fot. n. 1) quasi completamente riempiti di latte, vengono chiusi con coperchio e generalmente, specie nella stagione fredda, avvolti con panni di lana e lasciati in luogo caldo (cucina). Normalmente il Kos viene preparato la sera per il mattino successivo, ma anche al mattino per essere consumato alla sera. Per quanto non si possono riferire cifre esatte circa la quantità di latte di pecora che viene trasformata in Kos, purtuttavia si può affermare che detta quantità è tutt'altro che trascurabile.

Il Kos si presenta come un coagulo compatto che ingloba completamente il siero. Gli albanesi consumano il Kos come tale, ma generalmente con aggiunta di pane, non di rado specie nella stagione calda viene consumato mescolandolo con verdure crude (cetrioli, pomodori, ecc.) attenendosi così un piatto molto fresco che mangiato assieme al pane rappresenta per gli albanesi un piatto gradevole e leggero molto adatto allorchè il pasto del giorno è stato piuttosto abbondante.

Il Kos viene consumato dalla quasi totalità degli albanesi e pertanto è preparato non soltanto nelle case per uso della famiglia, ma anche smerciato dai venditori ambulanti; nei caffè e drogherie si può consumare il Kos direttamente oppure lo si può acquistare posto in piccoli recipienti di terracotta.

Per gentile interessamento di uno studente albanese di questa Facoltà Agraria, ho potuto esaminare due campioni di Kos prelevati nelle località di Korçe ed Elbasan. I due materiali, posti in vasetti di vetro e portati diret-

1) Il punto giusto di temperatura viene determinato immergendo nel latte il dito mignolo.

tamente dall'Albania, mi sono giunti dopo tre giorni dalla loro preparazione; essi si presentavano come un coagulo bianco porcellanaceo, compatto senza la minima traccia di siero.

Ho ritenuto pertanto utile sottoporre i due campioni di Kos ad un accurato studio microbiologico. Lo studio si è iniziato con l'esame microscopico eseguito sia a fresco come previa colorazione. In ogni caso e per ambedue i materiali, l'esame microscopico ha dimostrato che il Kos albanese non diversifica per quanto riguarda le forme microbiche, di quanto avviene in altri similari prodotti che vanno sotto il nome di bevande fermentate del latte, e precisamente si è osservata una simbiosi di blastomiceti e schizomiceti come chiaramente mostra la fot. n. 2.

Prima però di riferire le ricerche e le analisi da me eseguite sul Kos ritengo opportuno ricordare, per rapidi cenni, le nostre conoscenze su prodotti simili. Una bevanda acido-alcoolica propria dei paesi del Caucaso e preparata con latte di vacca o di pecora o di capra e con speciali granuli è il Chefir. Detto materiale che può essere consumato entro le prime ore come dopo 48 ore dalla preparazione, presenta ancora una certa quantità di lattosio mentre la maggior parte dello zucchero è stata trasformata in alcool (fino all'1%) e in acido lattico; la caseina è solo in piccolissima parte peptonizzata. Secondo ricerche di vari autori: Kern (1), Beijerinck (2), Freudencih (3), Jörgensen (4), Dombrowsky (5), Nicolajewa (6), Kuntze (7), mie (8) e di molti altri risulta evidente che i microrganismi produttori del Chefir debbono essere considerati i fermenti lattici e i fermenti alcoolici. Simile al Chefir è il Cumis, bevanda molto usata nella Russia e preparata da latte di giumenta e anche di asina e di cammella. Secondo Rubinsky (9) la flora microbica del Cumis si deve considerare come una mescolanza di fermenti lattici e fermenti alcoolici. Simili alle due sopradette bevande, sia come caratteristiche organolettiche che come microflora, si possono considerare il Mazun che nell'Armenia viene preparato dal latte di bufala, pecora o capra e del quale si è interessato il Düggeli (10); e il Leben che si prepara in Egitto e che è stato particolarmente studiato da Rist e Khoury (11). Famoso è poi il Giogurt bulgaro e dell'oriente balcanico che è stato studiato da Grigoroff (12), Mazé (13), Guerbet (14), Severin (15) e moltissimi altri. Le memorie degli autori citati dimostrano chiaramente che anche il Giogurt si deve considerare come un latte ove prevalentemente è stato trasformato il lattosio per azione combinata di alcune specie di fermenti lattici e fermenti alcoolici. Anche in Italia vengono preparate, dal latte, bevande fermentate, così oltre al Gioddu sardo, del quale si sono particolarmente occupati Grixonni (16), Samarani (17) e Verona e Attolini (18), ho avuto modo di esaminare un materiale che preparano i pastori del Viterbese e che non si differenzia, come caratteristiche organolettiche e flora microbica, dai prodotti precedentemente ricordati. Verona (19) in una bevanda giavanese ottenuta dal latte ha riscontrato una flora microbica molto simile a quella del Giogurt bulgaro. Senza a starmi a dilungare ulteriormente è certo che in molti altri

paesi del mondo il latte viene trasformato in materiali molto simili a quelli che ho ricordati.

Nella presente memoria riferisco le analisi da me eseguite sul Kos albanese, del quale, per quanto mi consta, non si era finora interessato nessuno.

Per l'isolamento dei microbi del Kos mi sono servito dei normali procedimenti adoperando i seguenti terreni di coltura: agar e gelatina al siero di latte (ottenuti mescolando al momento dell'uso uguali quantità di siero di latte sterile con gelatina all'acqua al 20% di colla di pesce o di agar acqua al 3 % di agar agar), agar di latte, agar siero peptone e agar al decotto di grano (aggiunta dell' 1,5% di agar al decotto di grano) (20).

Per i terreni gelatinizzati le culture d'isolamento sono state eseguite per disseminazione e le piastre sono state mantenute in ambiente a 18°, per i terreni agarizzati sono state fatte culture per spandimento e le piastre sono state poste a 37°. Tra i terreni di coltura adoperati, ottimi risultati sono stati ottenuti dall'uso dell'agar al siero di latte e dall'agar al decotto di grano ove tanto i blastomiceti come gli schizomiceti crescevano abbastanza bene. Gli isolamenti sono stati eseguiti dopo aver fatto un accurato esame, sia macro che microscopico, delle colonie, allo scopo di isolare quelle che erano in netta predominanza. Con numerosi preparati per impressione allestiti sulle prime piastre, particolarmente ricche di colonie, ho potuto osservare che, oltre a colonie di blastomiceti (da riportarsi ad una stessa forma) si notavano colonie schizomicetiche costituite da streptococchi o da streptobatteri.

Sono stati pertanto eseguiti numerosi isolamenti sia pescando le colonie di blastomiceti come quelle di schizomiceti usando i seguenti terreni di coltura: siero di latte, mosto d'uva, latte e decotto di grano.

Ottenute così le culture pure esse sono state sottoposte all'identificazione colle modalità di studio normalmente usate per gli schizomiceti, per le culture blastomicetiche mi sono servito utilmente della tecnica indicata dalla Stelling-Dekker (21) e dalla Lodder (22). Non ritengo necessario esporre dettagliatamente la tecnica seguita; nella descrizione delle forme isolate ne verrà dato qualche rapido cenno.

Lo studio di identificazione eseguito sulle molte culture isolate ha dimostrato che esse dovevano riportarsi a quattro diverse forme microbiche e precisamente ad una specie batterica, a due specie di streptococchi e ad una specie di blastomiceti.

Inizio col descrivere la forma batterica.

In tutti i substrati di coltura il germe si presenta in forma allungata delle dimensioni medie di μ 1,8 - 2,2 x 0,7 - 0,9; in quasi tutti i terreni di coltura molti elementi cellulari rimangono riuniti a costituire spesso lun-

ghissime catene. Non è stata mai osservata mobilità e la colorazione delle ciglia ha sempre fornito esito negativo. Non è stata mai osservata produzione di spore; nelle culture in latte e specialmente se i preparati vengono colorati con bleu di metilene si osservano numerose granulazioni che assumono molto più intensamente il colore (v. fot. n. 3).

Il germe è grampositivo; molto spesso si osserva in una lunga catena qualche elemento scarsamente colorato in violetto o addirittura gramnegativo.

Nelle piastre di agar siero di latte e agar al decotto di grano dopo 4-5 giorni a 37° si osservano piccole colonie rotonde, di 1-2 mm di diametro, schiacciate, espanse, di colore bianco grigio; osservate a piccolo ingrandimento esse mostrano un nucleo centrale più scuro e la parte periferica più chiara. Nei preparati per impressione colorati con liquido di Ziehl diluito, la colonia si presenta rotonda, il materiale microbico è più denso al centro che pertanto appare più colorato mentre ai bordi si possono ben chiaramente osservare le forme microbiche (v. fot. n. 4). Le culture per striscio nei terreni agarizzati (agar siero di latte - agar al decotto di grano - agar di latte - agar siero peptone) mantenute a 37° presentano patine scarsissime, discontinue di colore bianco grigio. Le culture negli stessi terreni gelatinizzati mantenute per oltre 10 giorni a 18° non mostrano sviluppo apprezzabile. Nel brodo di carne e nell'agar di carne non si osserva sviluppo e così pure manca completamente la crescita nelle culture in gelatina di carne sia allestite su piastre come per infissione.

L'ottimo e i limiti di temperatura sono stati ricercati allestendo culture su diversi terreni di cultura sia liquidi come solidi (siero di latte - decotto di grano - latte intero e scremato - agar siero peptone - agar siero di latte - agar al decotto di grano) e ponendole alle temperature di 10° - 15° - 20° - 25° - 30° - 35° - 40° - 45° e 50°. L'ottimo di temperatura si deve considerare verso i 45°; le culture in latte, sia intero come scremato, a detta temperatura si presentano coagulate entro 16 ore mentre a 37° la coagulazione si osserva dopo 36 ore e a 30° e 25° rispettivamente dopo due e tre giorni. Alle temperature di 10° - 15° - 20°, anche dopo 15 giorni, le culture in latte sia intero come scremato non mostrano modificazione del substrato. Il coagulo si presenta compatto con scarsissima separazione di siero e non viene minimamente peptonizzato. La ricerca dell'eventuale produzione di gas e di acidità è stata eseguita su culture allestite con brodo di carne zuccherato e tornasolato posto in provette Durham; si è anche ricercata la modificazione del pH del terreno di cultura, determinando questo su provette insemenate e non insemenate col microrganismo ma mantenute per lo stesso periodo di tempo in termostato a 37°, servendomi di un potenziometro. In tutti i saggi eseguiti il germe si è dimostrato incapace a produrre gas mentre ha mostrato capacità a produrre acidità da: glucosio - levulosio - mannosio - galattosio e lattosio, non ne produce da arabinosio - xilosio - maltosio - saccarosio e raffiniosio. Seguendo la classificazione proposta da Bergey (23) il germe si deve

riportare alla famiglia delle *Lactobacteriaceae*, al genere *Lactobacillus* ed alla specie *Lactobacillus bulgaricus* (Luerssen e Kühn) Holland.

La prima forma streptococcica che descrivo presenta i seguenti caratteri.

In tutti i substrati di cultura il germe presenta cellule di forma rotonda di μ 1-1,2, riunite generalmente in catene formate di molti elementi (v. fot. n. 5).

Cellule immobili, grampositive.

Nelle piastre di agar siero di latte, agar di grano e agar siero peptone, si notano colonie piccole, gibbose, mucose di colore bianco grigio.

Nelle culture per striscio sugli agar sopraricordati si osservano patine sottili, delicatissime di colore grigiastro, a volte discontinue e costituite da una serie di piccole coloniette. Nelle culture sui terreni gelatinizzati mantenute a 20° lo sviluppo è quasi nullo e la gelatina non viene fluidificata. Nei terreni a base di carne (brodo-gelatina ed agar) non si nota sviluppo apprezzabile.

L'ottimo di temperatura, ricercato sui diversi terreni di cultura, si deve considerare intorno a 50°. A detta temperatura il latte, sia integro come scremato, viene coagulato in 12-14 ore. Alle temperature di 37° e 30° il latte viene coagulato rispettivamente in 30 e 48 ore, mentre a temperature più basse il latte non subisce alcuna modificazione. Il coagulo del latte si presenta compatto con separazione di piccole quantità di siero e non viene peptonizzato. Il microrganismo non è capace di produrre gas ma forma acido da glucosio-levulosio-mannosio-galattosio-lattosio, pochissimo da maltosio e saccarosio e affatto da xilosio-arabinosio e raffiniosio. Seguendo la sistematica precedentemente ricordata la forma descritta rientra nella famiglia delle *Lactobacteriaceae*, al genere *Streptococcus* e nella specie *Streptococcus thermophilus*. Orla Jensen.

L'altra forma streptococcica ha i seguenti caratteri.

In tutti i terreni di cultura il germe si presenta in forma rotonda o leggermente lanceolata. Le cellule sono riunite più che altro a due o in corte catene di cinque-otto elementi delle dimensioni medie di μ 0,8-1 (v. fot. n. 6), c si presentano immobili e grampositive.

Nelle piastre di agar siero di latte, agar di grano e agar siero peptone si osservano colonie molto piccole, schiacciate, delicate di colore bianco grigio.

Nelle culture per striscio si notano patine delicatissime, non continue, di colore grigio chiaro. Nelle culture, sia su piastre come per infissione, su terreni gelatinizzati mantenute a 20° lo sviluppo è scarsissimo e non si nota traccia di fluidificazione.

L'ottimo di temperatura è intorno a 30°-35°; in dette condizioni le culture in latte formano coagulo entro 16 ore. A 45°, come a temperature supe-

riori, non si osserva sviluppo. Il coagulo del latte è compatto e senza separazione di siero; anche dopo un mese il coagulo non mostra traccia di peptonizzazione. Il microrganismo non produce gas dagli zuccheri, forma però acido da glucosio-levulosio-galattosio-lattosio e xilosio, non da arabinosio-maltosio-saccarosio e raffinatio.

Lo stipite descritto, seguendo i criteri precedentemente esposti, può essere identificato con *Streptococcus lactis* (Lister) Löhnis.

La forma blastomicetica presenta i seguenti caratteri.

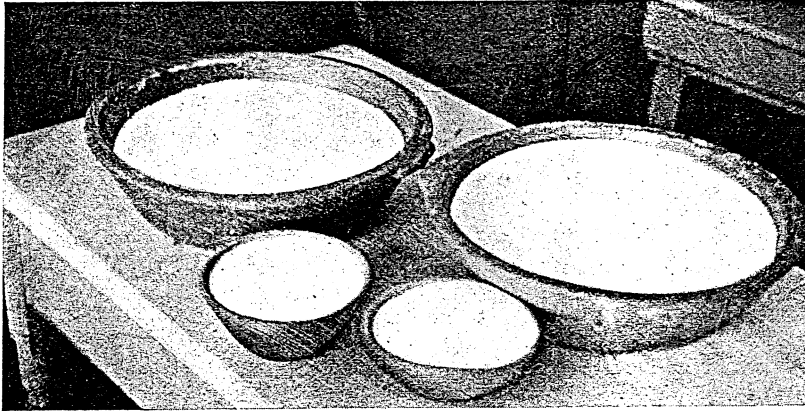
Nelle culture in mosto d'uva e nell'infuso di malto (a 15 Be) dopo 24 ore alla temperatura di 25° si osservano cellule piccole, ovali e gemmate, isolate o a due o a gruppetti formati da pochi elementi. La vegetazione è del tipo *Torulopsis*. Dimensioni medie μ 4,2-5,5 \times 3-3,8 (v. fot. n. 7). Nel decotto di grano le dimensioni sono le medesime ma generalmente le cellule sono riunite a gruppi di 10 e più elementi senza formare però una traccia di micelio. Anche nel latte le dimensioni e gli aggruppamenti cellulari sono simili a quelli osservati nel mosto e nell'infuso di malto.

Le culture in agar di malto (preparato con infuso di malto a 10 Be e 2% di agar) dopo 3 giorni a 25° mostrano cellule piccole ovali, gemmate, isolate o riunite a gruppetti di pochi elementi. Le dimensioni sono quelle osservate per le culture in mosto. Le culture in agar Gorodkowa mostrano cellule di dimensioni uguali e disposte come nelle culture in agar malto. Anche nelle culture in agar siero di latte e nell'agar siero peptone non si notano differenze sensibili colle dimensioni notate negli altri terreni.

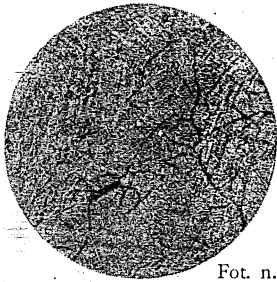
Le culture in mosto ed in malto presentano dapprima intorbidamento, poi fermentazione e successivamente, specie nelle culture in malto, un tenue anello superficiale bianco che si mette bene in evidenza agitando la provetta. Nel decotto di grano e nel siero di latte si osserva un sottilissimo velo bianco leggermente risaliente. Le culture in latte non mostrano apprezzabile trasformazione del substrato di cultura.

Nell'agar di malto la patina è dapprima scarsa, mucosa e di colore bianco grigio, invecchiando la cultura la patina si fa abbondante ma rimane sempre mucosa e di colore bianco sporco e liscia sia in centro come ad i bordi. Nell'agar Gorodkowa la patina, sia nelle culture giovani come in quelle vecchie di due mesi, si presenta scarsissima, umida, liscia e del colore del substrato di cultura.

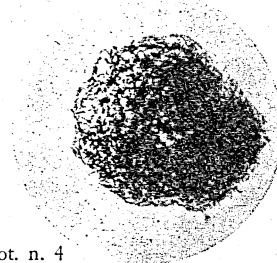
Nelle piastre di gelatina di mosto (per disseminazione in tubi di gelatina all'acqua col 20% di colla di pesce, ai quali si aggiungevano uguali volumi di mosto d'uva sterilizzato) dopo 4 giorni a 16° si osservano colonie rotonde, mucose, lisce in superficie ed a margini netti ed uniti, di colore bianco grigio. Dopo 6 giorni le colonie si circondano di un alone di liquefazione e dopo 10 giorni le piastre mostrano la gelatina completamente fluidificata. Nelle piastre di gelatina al siero di latte le colonie dopo 4 giorni a 16° sono fortemente caratteristiche; esse si presentano rotonde con cocuzzolo centrale dal quale mediante forti solcature si va ad i bordi che sono fortemente solcati e corru-



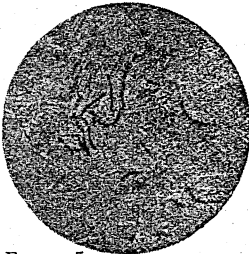
Fot. n. 1



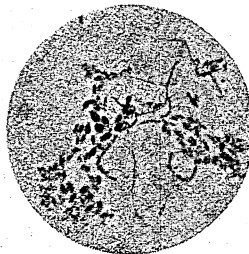
Fot. n. 3



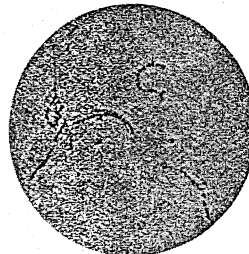
Fot. n. 4



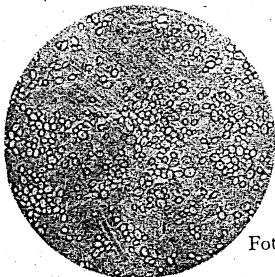
Fot. n. 5



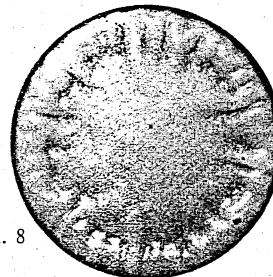
Fot. n. 2



Fot. n. 6



Fot. n. 7



Fot. n. 8

N.B. - La fotografia n. 1 è circa 1/5 della grandezza naturale. L'ingrandimento per le microfotografie dal n. 2 al n. 7 è di 400 diametri, per la microfotografia n. 8 di 20 diametri.

gati (v. fot. n. 8). L'infissione in gelatina di mosto dopo 15 giorni a 16° mostra sviluppo a chiodo con testa superficiale espansa e scarsa crescita lungo il canale d'innesto, la gelatina si presenta fortemente rammollita. Invecchiando la cultura la patina superficiale tende a sprofondarsi nella gelatina fusa. Dopo 30 giorni a 16° la liquefazione, che si presenta a cilindro, ha raggiunto un terzo del tubo.

La colonia gigante, preparata colla tecnica abituale su gelatina di mosto, si presenta dapprima scarsamente sopraelevata, rotonda, liscia e a margini netti di colore bianco sporco; successivamente per la fusione della gelatina la patina si immerge nel substrato. La colonia gigante non presenta pertanto nulla di caratteristico.

La ricerca della sporificazione eseguita su culture in agar di malto, agar Gorodkova, blocchetti di gesso e silice gelatinosa (24) ha dato sempre risultato negativo. I saggi di fermentazione sono stati eseguiti su brodo di carne con l'aggiunta del 2 % dei seguenti zuccheri: glucosio-levulosio-mannosio-galattosio-maltosio-saccarosio-lattosio e raffinosisio, sia usando le provette Einhorn come il dispositivo Durham. Lo stipite descritto fermenta attivamente il glucosio, levulosio, mannosio, galattosio e molto lentamente e scarsamente il saccarosio. Il maltosio, il lattosio e il raffinosisio non vengono fermentati.

I saggi per lo sviluppo in presenza di alcool etilico come quelli per l'assimilazione delle sostanze azotate sono stati fatti seguendo le norme indicate dalla Stelling-Dekker e dalla Lodder. Il germe sviluppa molto bene in presenza di alcool etilico; tra le sostanze azotate assimila bene il solfato ammonico, l'urea, l'asparagina e il peptone, quasi affatto il nitrato di potassio.

La produzione di alcool è stata ricercata su mosto d'uva zuccherato e sterilizzato alla pentola di Koch per 40 minuti senza allontanarne le parti coagulate e precipitate. Dopo 30 giorni alla temperatura di 16° la determinazione dell'alcool per distillazione ha dimostrato che il germe è capace di produrre il 2,5% di alcool in peso (3,15% in volume).

La mancanza di capacità a produrre spore e le caratteristiche degli aggruppamenti cellulari fanno rientrare la forma descritta nella famiglia delle *Torulopsidaceae*, nella sottofamiglia delle *Torulopsoideae* e nel genere *Torulopsis Berlese*. Ho eseguito pertanto confronti tra i caratteri dello stipite da me descritto e quelli di molte specie di *Torulopsis* riportate nella monografia della Lodder e in alcuni lavori di Sacchetti (25), di Luchetti e Nanni (26) e di Luchetti (27). Il mio stipite non può essere identificato con nessuna delle specie descritte da Sacchetti, Luchetti e Luchetti e Nanni. Tra le specie riferite dalla Lodder il mio stipite presenta notevoli analogie con la *Torulopsis Holmii* (Jørgensen) Lodder e particolarmente con la specie isolata dal burro e descritta da Kluyver come *Torula alactosa*, ma che secondo la Lodder cade in sinonimia con *Torulopsis Holmii*. Le uniche differenze tra il mio stipite e la *Torulopsis Holmii* riguardano la fermentazione del raffinosisio che è positiva per un terzo nella *Torulopsis Holmii* e manca completamente nel mio stipite e perchè quest'ultima forma gode della capacità di liquefare, sia

pure tardivamente la gelatina, proprietà che invece non si riscontra nella *Torulopsis Holmii*. Siccome però tutti gli altri caratteri concordano, ritengo che lo stipite da me descritto possa venir considerato come una varietà della *Torulopsis Holmii* della quale riporto una breve diagnosi.

Torulopsis Holmii var *Kos*. n. var.

cellule ovali, isolate o a due, o a piccoli gruppetti di μ 3 - 3,8 \times 4,2 - 5,5.

Nel mosto come nel malto si ha fermentazione, deposito ed anello superficiale. Fermentazione del glucosio - levulosio - mannosio - galattosio e molto lenta del saccarosio. Tra le sostanze azotate assimila molto bene il solfato ammonico, l'urea, l'asparagina e il peptone, quasi affatto il nitrato potassico. In presenza di alcool etilico sviluppa molto bene. Fluidificazione molto tardiva della gelatina. Nell'agar di malto si hanno patine mucose, liscie di colore bianco grigio. La capacità a produrre alcool è piuttosto modesta e precisamente del 2,5% in peso (3,15 in volume). Habitat: nel Kos albanese.

Le ricerche da me eseguite dimostrano chiaramente che la microflora del Kos albanese non diversifica sostanzialmente da quello che normalmente si verifica nelle bevande fermentate del latte, e cioè anche in esso si riscontrano fermenti lattici e fermenti alcoolici. Ho creduto opportuno preparare il Kos in laboratorio, sia partendo dal latte di pecora come da quello di vacca ed eseguire su detto materiale alcune indagini di indole chimica. Uguali quantità di latte di pecora e di vacca fatte bollire per 2 minuti e raffreddate a 45° sono state seminate con un ansata delle singole forme microbiche isolate e indi poste in termostato a 37°. Dopo 24 ore ambedue i materiali si presentavano coagulati con scarsissima separazione di siero. Il coagulo, specie per il Kos ottenuto dal latte di pecora, era molto compatto. Sia l'odore come il sapore, dei detti materiali, erano gradevoli. Le analisi chimiche hanno dimostrato che nel Kos di 24 ore a 37° sia le sostanze proteiche come le sostanze grasse non subiscono sensibili modificazioni mentre il lattosio viene in gran parte trasformato come dimostra il sottostante specchietto.

Kos preparato dal latte di pecora: Acidità in acido lattico 0,81 %; alcool 0,45 %. Kos preparato dal latte di vacca: Acidità in acido lattico 0,72 %; alcool 0,30 %.

Le mie ricerche portano pertanto alle seguenti conclusioni:

1. La bevanda che gli albanesi preparano con latte di pecora e che chiamano Kos non diversifica sostanzialmente, sia come microflora che per caratteri organolettici, di quando avviene per i materiali indicati come bevande fermentate del latte.

2. I microbi responsabili della trasformazione del latte di pecora nel Kos sono il *Lactobacillus bulgaricus*, lo *Streptococcus thermophilus*, lo *Streptococcus lactis* e la *Torulopsis Holmii* var. *Kos*.

3. Nella trasformazione del latte di pecora in Kos è essenzialmente il

lattosio che viene attaccato. Nel Kos preparato a 37° per 24 ore l'acidità espressa in acido lattico è del 0,81 % mentre l'alcool è del 0,45 %. Nel Kos preparato con uguali modalità, ma usando latte di vacca, i valori dell'acidità come dell'alcool sono leggermente inferiori.

RIASSUNTO

Sono state condotte ricerche microbiologiche sul Kos, un materiale di abbastanza largo consumo, che gli albanesi ottengono dal latte di pecora. Sono state isolate tre diverse specie di fermenti lattici ed una specie di blastomiceti appartenente al genere *Torulopsis*. Le trasformazioni che il latte di pecora subisce nella trasformazione in Kos riguardano sostanzialmente il lattosio. Un Kos di 24 ore a 37° presenta un'acidità, espressa in acido lattico, del 0,81 % e il 0,45% di alcool.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über an « Kos » angestellte mikrobiologische Untersuchungen berichtet. Kos ist ein ziemlich viel gebrauchtes Material, das in Albanien aus Schafmilch gewonnen wird. Es werden daraus drei verschiedene Arten von Milchfermenten und eine Blastomycetenart die zur *Torulopsis*gruppe gehört isoliert. Die Veränderungen welche die Schafmilch bei ihrer Umwandlung in Kos erleidet betreffen hauptsächlich den Milchzucker. Ein 24 stündiger Kos zeigt bei 37° eine Azidität von 0,81% Milchsäure und 0,45% Alkohol.

RÉSUMÉ

L'A. a exécuté des recherches microbiologiques sur le « Kos », matériel dont on fait un emploi assez large et que les albanais obtiennent du lait de brebis. On a isolé trois espèces diverses de ferments lactiques et une espèce de blastomycète appartenant au genre *Torulopsis*. Les transformations subies par le lait de brebis au cours de la production du « Kòs » se rapportent essentiellement au lactose. Un « Kos » de 24 heures à 37°C., présente une acidité, exprimée en acide lactique, de 0,81% et le 0,45% d'alcool.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *Kern* - Bot. Zeit., 1882.
- (2) *Beijerinck* - Cent. f. Bakt. Band. 6, 1889.
- (3) *Freudenreich* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 3, 1897.

- (4) *Jørgensen* - Die Microorg. der Garung. 5 Ediz. Berlino, 1909.
- (5) *Dombrowsky* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 28, 1910.
- (6) *Nicolajewa* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 21, 1908. (7)
Kuntze - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 24, 1909.
- (8) *Castelli* - Boll. Istit. Sierot. Milanese, Fasc. 12, 1931.
- (9) *Rubinsky* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 28, 1910.
- (10) *Düggeli* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 15, 1905-1906.
- (11) *Rist e Khoury* - Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 16, 1902.
- (12) *Grigoroff* - Jahr Fort. Gahrung Band 16, 1905.
- (13) *Mazé* - Ann. de l'Inst. Pasteur, T. 19, 1905.
- (14) *Guerbet* - Compt. rend. Soc. Biol. T. 60, 1906.
- (15) *Severin* - Cent. f. Bakt. 2 A. Band 22, 1908.
- (16) *Grixoni* - Ann. Med. Nav. Vol. 1, 1905.
- (17) *Samarani* - Ann. R. Staz. Caseificio, Lodi, 1907.
- (18) *Verona e Attolini* - Boll. R. Ist. Sup. Agr., Pisa, 1933.
- (19) *Verona* - Boll. R. Ist. Sup. Agr., Pisa, 1933.
- (20) *Castelli* - Giorn. Biologia Ind. Agr. e Alim., Anno 7, 1937.
- (21) *Stelling-Dekker* - Die Sporogenen Hefen. Uitgave Van De Koninklijke Akad Van Vetenschapen. Amsterdam, 1931.
- (22) *Lodder* - Die Anaskosporogenen Hefen. N V. Noord-Hollandsche Uitgeversmaatschappij. Amsterdam, 1934.
- (23) *Bergey* - Man. of Deter. Bact. 5 Ediz. Baltimora, 1939.
- (24) *Castelli* - Boll. Ist. Sierot. Milanese, Fasc. 10, 1935.
- (25) *Sacchetti* - Archiv f. Mikrobiologie, 4 Band, 4 Heft, 1933.
- (26) *Luchetti e Nanni* - Nuovi Annali dell'Agricoltura, 1935.
- (27) *Luchetti* - Atti Soc. Toscana Scien. Nat., Vol. 46, N. 3, 1936.

I processi di acidificazione dei foraggi insilati

Dott. Isidoro Politi

(Ricevuto il 20 Maggio 1940)

Le ricerche compiute, in varie epoche e con differenti criteri sperimentali, sui processi fermentativi dei foraggi insilati, hanno condotto a conclusioni e ad ipotesi non concordanti in merito agli agenti che principalmente presiedono alla acidificazione dei foraggi medesimi. Da prima, e specialmente in base ai lavori di S. M. Babcock e H. L. Russell (1), si attribuì una grande importanza alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali, ritenendo queste come i principali agenti dell'acidificazione; ma poi, con l'accrescersi delle conoscenze sulle azioni microbiche del silaggio, l'opinione del prevalente concorso batterico venne via via rafforzandosi, sino ad essere quasi da tutti accettata. Specialmente notevoli a questo riguardo sono le ricerche di A. R. Lamb (2) il quale concluse appunto che i batteri sono i principali responsabili della produzione di acidi.

Solo nel 1929 S. H. Hansen (3) espresse l'opinione che nello stadio di fermentazione anaerobica l'acidificazione enzimatica possa raggiungere valori espressi da $\text{pH} = 3,7$, mentre nel 1932 B. Curin (4), attraverso ricerche compiute mediante l'impiego di antisettici, pervenne alla conclusione che la maggior parte degli acidi del silaggio è d'origine batterica. Qualche anno dopo le ricerche di questa Stazione apportavano un contributo che poteva ritenersi decisivo, sia nei riguardi della natura degli agenti microbici che presiedono all'acidificazione dei foraggi fermentanti a temperature non superiori a 37° - 40° , sia anche a favore della prevalente origine batterica dell'acidità dei foraggi medesimi. Infatti:

Attraverso l'esame di foglie e steli di foraggiere diverse, prelevati sterilmente, Arnaudi (5) ha riscontrato che i batteri acidificanti sono sempre presenti nei foraggi in pieno campo; però il loro numero è relativamente scarso (nei 51 campioni esaminati da 1200 a 23.000 germi per g); ma già con le operazioni di falciatura e di raccolta esso aumenta alquanto, raggiungendo facilmente cifre di alcuni milioni per g.

L'intensissimo sviluppo dei microrganismi acidificanti nel corso della fermentazione è stato poi accertato dallo scrivente (6) che, attraverso numerose prove di fermentazione, ha constatato come nel volgere di breve tempo il loro numero raggiunga cifre assai spesso superiori al mezzo miliardo per

g; in pari tempo il foraggio subisce un'intensa acidificazione e la completa fermentazione degli zuccheri solubili; la correlazione riscontrata fra lo sviluppo dei batteri acidificanti e la produzione di acidi è rappresentata dal diagr. della fig. 1.

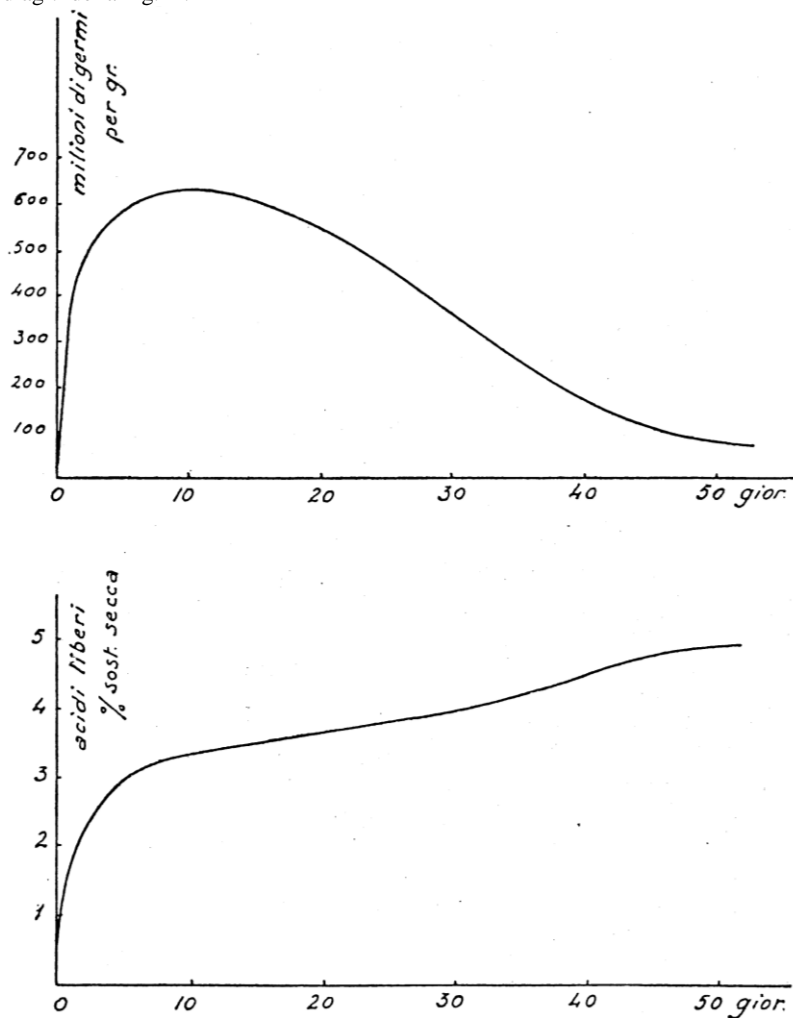


Fig. 1. - Variazioni nel contenuto batterico e nel contenuto in acidi liberi, nel corso della fermentazione in un'esperienza con microsili.

Pure lo studio e l'identificazione specifica della microflora acidificante dei foraggi sono stati iniziati e compiuti, si può dire ex-novo, da questa Stazione, giacchè in passato la maggior parte delle ricerche effettuate sull'argomento si era limitata ad indicare solo la presenza di batteri classificati in modo affatto generico come fermenti lattici. Il sistematico controllo

batteriologico di un gran numero di insilati, prove di fermentazione in microsili ed esperienze di insilamento in vasche hanno consentito di isolare in coltura pura numerosi ceppi dei quali venne effettuato uno studio dettagliato con speciale riguardo ai loro caratteri fisiologici. I risultati di questi studi (5, 6, 7) dimostrano che la microflora acidificante del silaggio è costituita da microrganismi nettamente diversi dai comuni fermenti lattici del latte, perchè incapaci di intenso sviluppo in questo terreno, dotati di scarsa azione sul lattosio e fortemente attivi sui pentosi. I più importanti di essi sono stati riferiti alle due specie *Streptobacterium plantarum* O. Jensen e *Lactobacillus pentoaceticus* Fred, Peterson e Davenport ¹⁾; è stato pure accertato il concorso di altri microrganismi aventi molte proprietà fisiologiche e biochimiche simili a quelle dei predetti.

Tutti questi microrganismi danno come prodotto principale l'acido lattico; ma le loro proprietà fisiologiche spiegano anche l'origine dell'acido acetico che si riscontra sempre, sebbene in quantità assai variabili, nei foraggi insilati; fermentando i pentosi essi producono infatti acido lattico ed acetico in proporzioni pressochè equivalenti, mentre il *Lactobacillus pentoaceticus* produce cospicue quantità di acido acetico anche dal glucosio e più ancora dal levulosio; inoltre, nella fermentazione di questo zucchero, il germe medesimo dà origine ad abbondanti quantità di mannite, la cui presenza nel silaggio di mais è stata pure segnalata.

Rimarchevole è anche la proprietà, rilevata da Arnaudi (5), che i suddetti microbi hanno di intaccare lo xilano, fermentandone i prodotti di idrolisi.

Le sistematiche ricerche compiute dalla nostra Stazione, integrando e coordinando le piuttosto frammentarie ed incomplete osservazioni batteriologiche fatte precedentemente, hanno quindi dimostrato come nelle trasformazioni cui soggiacciono i foraggi fermentanti a temperature non superiori a 37-40° si abbia sempre un intensissimo intervento di batteri acidificanti. Appariva così assai attendibile l'ipotesi della prevalente acidificazione microbica. A opposte affermazioni pervennero però nel frattempo Pratolongo e Fabris (8, 9); secondo questi A.A. il normale processo di acidificazione dei foraggi insilati sarebbe di natura enzimatica ed endocellulare, suscettibile di svolgersi con grande prontezza ed intensità sino al raggiungimento di acidità espresse da valori del pH prossimi a 4, indipendentemente da qualsiasi concorso batterico. Pertanto è parso di grande interesse istituire una nuova serie di ricerche atte a risolvere in modo definitivo il dibattuto quesito, la cui importanza è anche in special modo di carattere pratico, in quanto è alla

¹⁾ La presenza nei foraggi insilati di batteri di queste due specie era stata segnalata in precedenza anche da qualche altro Autore, senza però che il preminente sviluppo dei microrganismi medesimi venisse dimostrato con sistematiche ricerche.

Secondo C. S. Pederson il *Lactobacillus pentoaceticus* si identifica con *Lactobacillus brevis* (O. Jensen) Bergey et al.

precisa conoscenza dei processi fermentativi e dei loro agenti che deve appoggiarsi la tecnica del razionale insilamento dei foraggi. Per queste ragioni e sotto la direzione del Prof. Arnaudi, sono state effettuate le esperienze di cui segue l'esposizione; di esse si è già in parte riferito con una precedente nota (10), mentre le indagini tuttora proseguono al fine di integrare ulteriormente i risultati sinora raccolti e di chiarire nel medesimo tempo qualche lato più interessante del complesso problema.

È noto, sin dalle classiche esperienze di Pasteur, che in assenza completa di ossigeno il normale processo respiratorio delle cellule vegetali risulta sostituito dalla cosiddetta respirazione intramolecolare, dalla quale traggono origine, come prodotti principali, alcool etilico ed anidride carbonica, attraverso un complesso di fenomeni biochimici analoghi a quelli della fermentazione operata dai lieviti.

Si comprende quindi come allo svolgersi di codesti processi di respirazione anaerobica sia per la massima parte da attribuire l'abbondante sviluppo di anidride carbonica che accompagna la fermentazione dei foraggi insilati; e così pure un complesso di modificazioni, tra cui il caratteristico odore alcoolico-etero dei buoni insilati. È logico altresì ammettere che ai processi medesimi possa essere dovuta anche una produzione di acidi organici, ma sempre in proporzioni esigue, cioè contenute nei limiti delle quantità di acidi che accompagnano, come prodotti secondari, la fermentazione alcoolica. Ciò significa che le elevate quantità di acido lattico che si formano nella fermentazione dei foraggi non sembrano attribuibili alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali; a meno di non supporre che in condizioni anaerobiche, la respirazione intramolecolare possa svolgersi anche con l'andamento della fermentazione lattica, oltre che con quello della fermentazione alcoolica, il che però non è stato ancora dimostrato.

Accanto alle trasformazioni endocellulari, dovute alle attività fisiologiche del protoplasma vivente, vanno considerate quelle determinate dagli enzimi contenuti nelle stesse cellule vegetali, le cui azioni si possono esplicare anche dopo la morte delle cellule medesime. Per la sola azione di questi enzimi possono formarsi delle notevoli quantità di acidi? Le esperienze di Babcock e Russell lo escluderebbero, poichè mantenendo il foraggio in presenza di anestetici (etere, cloroformio, benzolo), i quali determinano una rapida cessazione delle attività batteriche, rispettando però gli enzimi ¹⁾, si ottiene un foraggio fermentato tipico come colore ed aroma, ma con scarsa acidità. È assai interessante notare che appunto in base a questo unico rilievo, ma in modo affatto arbitrario, i detti A.A. hanno attribuito la produzione di acidi alle attività dirette del protoplasma vivente. Nè gli altri rilievi compiuti pos-

¹⁾ Si noti in proposito che la presenza di anestetici, pur sospendendo la funzione clorofilliana, non impedisce lo svolgersi dei processi respiratori; gli anestetici non arrestano quindi se non parzialmente le attività vitali delle cellule.

sono essere considerati in favore di codesta loro ipotesi; essi infatti constatarono un certo parallelismo fra la vitalità delle cellule vegetali e l'intensità dell'acidificazione; ma è troppo evidente che i tessuti delle piante in piena fase di sviluppo e con la massima vitalità sono più acquosi con pareti cellulari meno ispessite, più diffusibili e più rapidamente intaccabili dagli agenti enzimatici e microbici, offrendo così condizioni più favorevoli all'intenso sviluppo batterico, il quale risulta favorito anche dalla stessa composizione dei succhi cellulari.

Pure le esperienze compiute con foraggio sottoposto a congelamento non riescono convincenti; il foraggio così trattato subì infatti un'acidificazione pari a quello della prova di controllo (foraggio non sottoposto a congelamento); mentre in una terza prova, effettuata con foraggio congelato e poi mantenuto in presenza di anestetici, non si ebbe alcuna acidificazione. È evidente, oltre che constatato dagli autori, che il preventivo congelamento non è valso ad inibire la microflora presente, la cui azione venne esclusa solo con gli anestetici impiegati nella terza prova; il fatto poi che il foraggio semplicemente congelato presentasse al termine dell'esperienza un odore sgradevole è ben comprensibile, dato che i microrganismi acidificanti, minorati dal congelamento, non hanno potuto prevalere nettamente sopra i microbi sporigeni (e quindi più resistenti) che sono per gran parte ad attività proteolitica. In complesso però è da notare che Babcock e Russell, considerando le trasformazioni tipiche del silaggio, non compresero fra le medesime anche l'acidificazione e non attribuirono ad essa quell'importanza di fattore conservativo che, riconosciuta più tardi, è oggi da tutti ammessa e ritenuta fondamentale per il buon esito della conservazione dei foraggi allo stato verde; e ciò, sia che si tratti di acidificazione fermentativa, oppure di aggiunta diretta di acidi.

Da quanto precede emerge chiaramente come l'ipotesi della prevalente origine enzimatica degli acidi sia stata enunciata più come una spiegazione di fenomeni che le scarse ed imperfette conoscenze sulla microflora del silaggio non consentivano di chiarire in modo soddisfacente, che come il risultato di sistematiche ricerche batteriologiche e chimiche. Ciò appare evidente anche dal citato lavoro di Babcock e Russell, in cui lo sviluppo microbico è riguardato essenzialmente come causa di alterazioni, senza alcuna distinzione fra i batteri che intaccano più o meno profondamente i costituenti ed il valore nutritivo dei foraggi ed i batteri che, oltre a non causare apprezzabili perdite di sostanze nutritive, concorrono efficacemente alla buona conservazione. Dalla lettura anzi del lavoro di Babcock e Russell si trae la netta impressione che per i detti A.A. i microbi presenti nei foraggi siano esclusivamente delle specie termofile e sporigene, non sospettando essi la eventuale presenza di altre specie microbiche.

Comunque una conclusione sicura al riguardo non può essere desunta che attraverso indiscutibili ricerche sperimentali; e tale è appunto il fine delle esperienze che qui si espongono. Alcune di esse sono state compiute in

condizioni analoghe a quelle degli Autori precedenti ed altre, a carattere affatto definitivo, operando in condizioni di assoluta sterilità, cioè evitando qualsiasi trattamento con antisettici, mediante l'impiego di vegetali nati e cresciuti sterilmente.

I. - ESPERIENZE MEDIANTE STERILIZZAZIONE CHIMICA DEL FORAGGIO

Alcune prove preliminari, compiute su erba medica, mediante l'impiego di diverse sostanze disinfettanti, dimostrarono subito la difficoltà di ottenere una completa sterilizzazione; ciò è apparso dovuto principalmente al fatto che non era facile ottenere che la soluzione impiegata bagnasse il materiale in tutte le sue parti superficiali. Perciò ed anche allo scopo di usare soluzioni microbicide il più possibile diluite, in modo da contenere nei più ristretti limiti l'azione delle medesime sulle cellule vegetali e sugli enzimi in esse contenuti, si è trovato opportuno di impiegare i soli steli di erba medica. Questi, privati delle foglie, vennero accuratamente sistemati in tre microsili e quindi sottoposti ai seguenti trattamenti:

1° trattamento con tachiolo diluito all'1% per 20' e susseguenti lavaggi con acqua distillata sterile;

2° trattamento con soluzione al 2% di Cu SO_4 per 30' e ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile;

3° controllo senza alcun trattamento.

La sterilizzazione venne effettuata nello stesso barattolo costituente il microsilo; l'eliminazione del liquido di sterilizzazione ed i successivi lavaggi con acqua sterile vennero effettuati con il dispositivo rappresentato nella fig. 2.

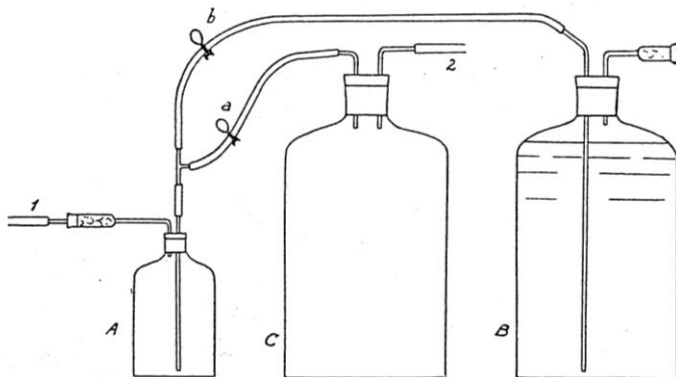


Fig. 2. - Dispositivo per la sterilizzazione chimica del foraggio. A: microsilo, B: bottiglione con acqua distillata sterile, C: recipiente per l'eliminazione dell'acqua di lavaggio. Chiudendo in *b* e aspirando da 2, si vuota il recipiente A. Chiudendo in *a* e aspirando da 1, si riempie A con acqua sterile.

Dopo l'ultimo lavaggio, ogni microsilo venne chiuso con tappo di gomma (previamente sterilizzato), attraversato da un tubicino per lo scarico dei prodotti gassosi della fermentazione; capovolgendo il microsilo e facendo pescare codesto tubicino in un bicchierino contenente dell'olio di vaselina, si provvide ad ottenere l'eliminazione completa dell'acqua residua dell'ultimo lavaggio e la chiusura idraulica del microsilo stesso.

I tre microsili vennero mantenuti per 7 giorni in termostato a 37°, e quindi il materiale venne utilizzato per le determinazioni chimiche e batteriologiche; i risultati ottenuti sono raccolti nella tab. I.

Durante la conservazione si constatò che in tutte le tre prove si ebbe sviluppo di gas; perciò è dato che la produzione di gas è dovuta principalmente ai processi respiratori delle cellule vegetali, si può ritenere che la vitalità delle cellule medesime non sia stata intaccata, se non in limitata misura, dai trattamenti di sterilizzazione effettuati.

È agevole rilevare che il trattamento con Cu SO₄ e con tachiolo, come era prevedibile, non hanno consentito di ottenere la completa sterilizzazione del foraggio; però il contenuto batterico finale delle prove 1^a e 2^a dimostra che si ebbe la eliminazione della microflora acidificante, mentre le forme sporigene, poterono, almeno in parte, sopravvivere e moltiplicarsi durante la conservazione. Nonostante ciò, nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri non subirono che una parziale degradazione, rispettivamente dei 44 e del 24 % del contenuto iniziale; e si noti che questo contenuto era piuttosto esiguo (1,24 % del materiale fresco).

TABELLA I

	pH	Acidità libera % sost. secca (come acido lattico)		Zuccheri riduttori % sost. secca		Contenuto microbico per g
		totale	incremento	presenti	fermentati	
Valore iniziale	5,8	0,94	—	8,3	—	n. d.
Prova 1 ^a	5,8	1,23	0,29	4,65	3,65	6.700.000
Prova 2 ^a	5,75	1,27	0,33	6,3	2	14.800.000
Prova 3 ^a	5,75	1,44	0,50	tracce	8,3	14.500.000

N.B. Il contenuto batterico delle prove 1^a e 2^a è costituito per la quasi totalità da sporigene; quello della prova 3^a, invece, quasi completamente da acidificanti.

Assai lievi furono del pari gli incrementi di acidità: praticamente immutato il pH e leggeri gli aumenti in acidi liberi.

Nella prova di controllo invece si poté constatare che mentre il contenuto batterico finale era costituito per la quasi totalità da germi acidificanti, gli zuccheri riduttori erano stati completamente fermentati. L'acidità, pur essendo un po' maggiore di quella delle due precedenti prove, non aveva però subito che uno scarso incremento; si tratta tuttavia dell'acidità libera e non della totale quantità degli acidi formati; perciò si può presumere che la

maggior parte di questi sia stata neutralizzata dalle sostanze basiche prodotte da una contemporanea degradazione delle sostanze azotate. Che nella prova di controllo si siano svolti dei processi di alterazione è apparso infatti evidente dall'odore piuttosto sgradevole del foraggio, mentre è naturale che nelle condizioni in cui si trovavano gli steli i microrganismi acidificanti, con molta probabilità presenti in esiguo numero, non abbiano avuto la possibilità di prevalere nettamente.

Ma anche prescindendo dall'andamento dei processi svoltisi in quest'ultima prova, dai risultati della presente esperienza si può dedurre che con la soppressione della microflora acidificante si ha una limitata fermentazione degli zuccheri e una scarsa produzione di acidi.

Per confermare codesta conclusione e nel medesimo tempo per dimostrare con maggior evidenza la prevalente natura batterica dei processi di acidificazione, si credette opportuno di ripetere l'esperienza allestendo quattro microsili con le seguenti modalità:

1° trattamento con tachiolo diluito all' 1 % per 20', ripetuti lavaggi con acqua distillata sterile, lavaggio finale con succo d'erba sterilizzato per filtrazione amicrobica.

2° trattamento con soluzione al 2 % di Cu SO_4 per 30', indi come N. 1.

3° trattamento con soluzione al 2% di Cu SO_4 per 30', indi come N. 1 e 2 e seminato con coltura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

4° nessun trattamento.

Il lavaggio finale con succo d'erba sterile venne compiuto allo scopo di favorire lo sviluppo dei batteri acidificanti nella prova 3^a; esso venne effettuato anche nella 1^a e 2^a per non creare diversità di condizioni iniziali all'in fuori della presenza dei detti batteri. Le modalità seguite sono per il resto le medesime della precedente esperienza.

I risultati delle determinazioni compiute dopo otto giorni di conservazione a 37° sono raccolti nella tab. II.

TABELLA II

	Valori iniziali	1°	2°	3°	4°
pH	5,75	5,5	5,2	4,15	5,05
Acidità libera - } Totale	0,95	1,5	2,3	5,13	3,5
% sostanza secca - } (come ac. lattico) { incremento	—	0,55	1,45	4,14	2,55
Zuccheri riduttori - } Presenti	7,0	2,6	4,5	tracce	assenza
% sost. secca } fermentati	—	4,4	2,5	7,0	7,0
Azoto totale % sost. secca . .	2,48	2,49	2,45	2,48	2,26
Azoto solubile % sost. secca .	n. d.	1,39	1,36	1,37	1,9
Azoto ammoniacale % sost. secca	n. d.	0,139	0,163	0,058	0,429
Contenuto batterico per g . .	n. d.	5.200.000	11.500.000	30.400.000	18.240.000

N.B. La flora microbica delle prove 1^a e 2^a era costituita da microrganismi sporigeni quella delle prove 3^a e 4^a, in prevalenza da acidificanti.

Anche in questa esperienza il trattamento con Cu SO_4 e con tachiolo fu sufficiente per eliminare la microflora acidificante ma non per sterilizzare completamente il foraggio, avendo le forme sporigene resistito ad esso. Ciononostante nelle prove 1^a e 2^a gli zuccheri subirono solo una parziale degradazione, in ragione rispettivamente del 60 e del 27 % dell'esiguo contenuto iniziale (1% del foraggio fresco) mentre gli incrementi di acidità furono assai lievi.

Nella prova 3^a invece gli zuccheri risultarono completamente fermentati ed il grado di acidità particolarmente elevato. Anche nella prova 4^a gli zuccheri subirono una totale fermentazione, mentre l'acidificazione, per quanto minore di quella della prova 3^a, risultò sensibilmente maggiore di quella delle prove 1^a e 2^a.

I contenuti in azoto solubile ed ammoniacale dimostrano inoltre che nella prova 4^a, a differenza delle altre tre, la proteolisi si era svolta con notevole intensità, neutralizzando una frazione cospicua degli acidi prodotti e perciò mascherando in parte i processi di acidificazione subiti dal foraggio. Risultano così confermati i risultati della precedente esperienza e perciò parrebbe logico concludere che sopprimendo la microflora acidificante i processi di acidificazione cui soggiacciono i foraggi risultano fortemente attenuati; la formazione degli acidi parrebbe cioè legata prevalentemente all'intervento microbico.

II - PROVE DI FERMENTAZIONE IN PRESENZA DI SOLUZIONI GLICERICHE

Si riempirono quattro microsili con 180 g di foraggio, costituito da pianticelle di sorgo trinciate e 520 g di soluzione idroglicerica al 20 % in volume, resa acida a $\text{pH} = 3$ mediante H_2SO_4 . (Il foraggio era completamente immerso nel liquido). I quattro microsili, muniti di chiusura idraulica, vennero mantenuti in termostato alla temperatura di 30°. Essi vennero aperti in tempi successivi, impiegandosi il materiale per la determinazione del pH del liquido, dell'acidità libera totale e del contenuto batterico. I risultati ottenuti sono riassunti nella tab. III.

TABELLA III

Determinazioni	pH	Acidità totale % del foraggio fresco iniziale (come ac. lattico)	Contenuto batterico per g di foraggio
Valore iniziale (foraggio fresco)	5,7	0,144	102.000.000
Dopo 1 giorno di fermentazione	5,2	n. d.	23.000.000
Dopo 3 giorni di fermentazione	4,1	1,40	636.000.000
Dopo 4 giorni di fermentazione	3,9	2,07	260.000.000
Dopo 7 giorni di fermentazione	3,45	2,64	960.000.000

È facile rilevare che durante il periodo di conservazione si ebbe una rapida ed intensa produzione di acidi; evidentemente la soluzione idroglicerica non ha impedito lo svolgersi dei processi di acidificazione e così pure non ha impedito un abbondante sviluppo microbico; gli opportuni mezzi colturali elettivi impiegati hanno anzi dimostrato trattarsi dei tipici microrganismi acidificanti del silaggio.

L'andamento dell'acidificazione è apparso inoltre in stretta relazione con lo sviluppo di codesti germi. Infatti, il contenuto batterico iniziale del foraggio risultò assai elevato; ma ciò non deve stupire poichè si tratta del numero dei germi al momento dell'aggiunta della soluzione idroglicerica e non del numero di quelli inizialmente presenti sulle pianticelle. In seguito alla trinciatura di queste e durante l'allestimento dei microsili, è evidente che essi ebbero tempo e modo di moltiplicarsi attivamente. Però dell'abbondante microflora presente all'inizio della conservazione, solo una piccola frazione era rappresentata da batteri acidificanti (fig. 3 a).

Il numero dei germi presenti dopo un giorno risultò assai diminuito, mentre dalle piastre di isolamento appariva chiara la prevalenza delle specie acidificanti (fig. 3 b). Evidentemente la soluzione idroglicerica acida aveva soppresso una frazione cospicua della flora microbica, favorendo in pari tempo la selezione delle specie presenti a favore degli acidificanti, d'altra parte avvantaggiati dalla presenza delle notevoli quantità di zuccheri offerti loro dal foraggio.

Al 3° giorno il contenuto batterico risultava notevolmente aumentato, presentandosi quasi come una coltura pura dei tipici acidificanti dei vegetali (fig. 3 c), mentre al giorno successivo si poteva constatare una diminuzione nel numero dei germi medesimi, i quali rappresentavano egualmente la quasi totalità della microflora del materiale in fermentazione. Al 7° giorno invece si è notato un nuovo fortissimo aumento che può essere agevolmente spiegato dal fatto che lo sviluppo microbico, dapprima limitato alla superficie dei

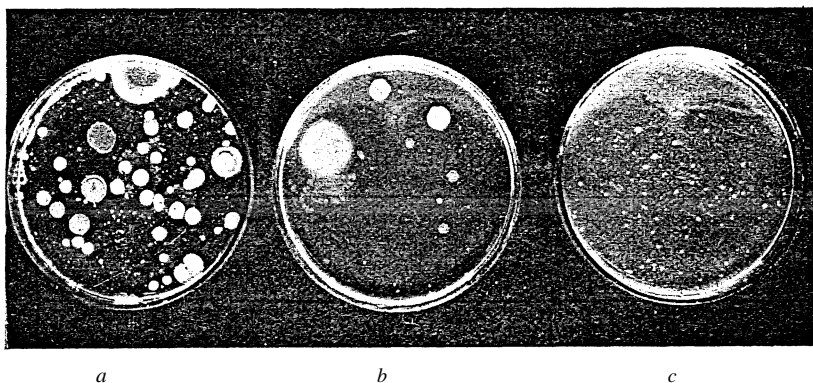


Fig. 3. - Piastre di agar malto nell'esperienza II.

TABELLA IV

ACIDIFICAZIONE DELL'INFUSO DI MALTO
ADDIZIONATO DI GLICERINA

Valori del pH dopo giorni	Controllo sterile	Lactob. pento- aceticus	Strept. plantarum	Bac. brassicae ferm.	Lact. Delbrücki	Ceppo Crema M	Ceppo Crema C	Ceppo Crema T	Ceppo Crema SP	Ceppo Crema 13/4
SENZA GLICERINA										
2	6	5,8	5,7	5,8	5,8	5,3	5,2	4,4	4,2	4,4
8	5,8	3,7	3,2	3,6	3,2	3,4	3,8	3,6	3,3	3,3
10 % DI GLICERINA										
2	6	5,5	5,9	6	5,8	5,7	5,2	4,9	5	5
8	5,8	3,8	3,6	3,9	3,6	3,3	3,9	3,5	3,2	3,4
15 % DI GLICERINA										
2	6	5,5	5,7	5,5	5,3	5	5	4,8	4,7	4,7
8	5,8	3,8	3,5	3,6	3,5	3,3	3,7	3,5	3,2	3,2
20 % DI GLICERINA										
2	6	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6	5,7	5,7	5,3	5,1
8	5,8	4,1	3,5	3,9	3,4	3,2	3,7	3,5	3,4	3,4
25 % DI GLICERINA										
2	6	5,8	5,7	5,6	5,5	5,3	5,2	5,7	5,5	5,8
8	5,8	4,9	4,3	4,5	3,9	4,2	4,4	4,6	4	4,2
30 % DI GLICERINA										
2	5,75	5,20	5	4,9	4,95	4,55	5,2	4,75	5,15	4,5
8	5,75	4,95	4,5	4,8	4,9	4,5	5,15	4,65	4,8	4,3
35 % DI GLICERINA										
8	5,75	4,95	4,7	4,93	4,8	4,55	5,45	4,85	4,85	4,75
40 % DI GLICERINA										
8	5,95	5,5	4,75	4,8	4,8	4,65	4,8	4,9	4,9	4,95

In presenza del 10% e del 15% di glicerina la moltiplicazione dei microrganismi è molto rapida; in 24 ore si ha un intenso intorbidamento delle colture; il loro comportamento è identico a quello delle colture senza glicerina.

Con il 20% di glicerina, Lact. pentoaceticus ed il ceppo Crema T si moltiplicano lentamente e solo dopo 6-7 giorni raggiungono uno sviluppo pari a quello degli altri ceppi.

Mediante il 25% di glicerina si ottiene uno sviluppo pressochè normale per Strept.

plantarum, Lact. Delbrücki e per i ceppi Crema M, SP, 13/4; tutti gli altri ceppi si sviluppano molto più lentamente.

L'aggiunta del 30 % di glicerina determina un discreto sviluppo del ceppo Crema 13/4; tutti gli altri microrganismi crescono assai lentamente.

Con il 35 ed il 40 % di glicerina la moltiplicazione è praticamente arrestata per tutti i ceppi; solo dopo 8 giorni si nota un leggero deposito sul fondo della provetta del ceppo 13/4.

L'esame microscopico delle colture come pure il grado di intorbidamento hanno servito per valutare la moltiplicazione dei microrganismi.

frammenti di foraggio, dopo il 5°-6° giorno potè svolgersi in tutto il liquido idroglicerico nel quale si erano frattanto diffusi i succhi vegetali.

Da quanto precede emerge che la soluzione idroglicerica al 20 % non è atta ad impedire l'intenso sviluppo dei batteri acidificanti dei vegetali. Questa constatazione ed altri rilievi, fatti in precedenti esperienze a carattere orientativo, ci indussero ad esaminare il comportamento di codesti microrganismi verso la glicerina. Vennero compiute delle prove di fermentazione che permisero di accertare che la maggior parte dei batteri acidificanti dei vegetali e specie simili ad essi sono effettivamente capaci di fermentare la glicerina, con produzione di acidi (7).

Alcuni ceppi, scelti fra quelli più tipici, isolati da foraggi verdi insilati, nonché da piante foraggere in pieno campo, vennero quindi seminati in provette contenenti infuso di malto sterile, addizionato delle sottoindicate quantità di glicerina e mantenute in termostato a 30°. Di tempo in tempo si controllò il grado di sviluppo e eli acidità; i risultati sono raccolti nella Tab. IV.

Questi risultati dimostrano in modo indiscutibile la notevole resistenza che i microrganismi esaminati presentano alla glicerina: sino a concentrazioni del 25 ed anche del 30 % si ha infatti una intensa o per lo meno evidente moltiplicazione, mentre al 35 - 40 % alcuni di essi, pur non presentando una palese moltiplicazione, sono ancora capaci di incrementare l'acidità. Tutti questi rilievi danno quindi una chiara spiegazione dell'intenso sviluppo di acidificanti riscontrato nell'esperienza sopradescritta, in cui il foraggio era immerso in una soluzione idroglicerica del 20 %. Essi pure dimostrano come non sia possibile impiegare la glicerina alle suddette concentrazioni come antisettico contro i fermenti lattici dei vegetali.

Per quanto precede, le recenti esperienze di Pratalongo e Fabris (9), in base alle quali gli A.A. hanno concluso che il normale processo di acidificazione dei foraggi insilati è di natura enzimatica, non possono avere alcun valore definitivo; infatti, nelle esperienze medesime venne impiegata come antisettico una soluzione di glicerina al 20 %, la quale non poteva impedire un intenso sviluppo dei batteri acidificanti. D'altra parte gli stessi A.A. hanno constatato che le soluzioni idrogliceriche al 30 % impediscono completamente l'acidificazione del foraggio; è evidente che in queste condizioni i pochi germi acidificanti inizialmente presenti non poterono moltiplicarsi, se non in misura ridotta e lentissimamente, anche perchè ostacolati dalla reazione spiccatamente acida del substrato; ma non per questo si può concludere

con sicurezza che la mancata acidificazione sia da attribuire al fatto che gli eventuali enzimi furono paralizzati dalla glicerina, giacchè la massima parte degli enzimi agisce normalmente anche in presenza del 30 % di glicerina.

Tutti questi rilievi dimostrano quindi come l'ipotesi della prevalente origine enzimatica degli acidi del silaggio non abbia trovato tuttora l'appoggio di indiscutibili dimostrazioni sperimentali.

III - ESPERIENZE PER ACCERTARE L'INTENSITÀ DELL'ACIDIFICAZIONE IN CONDIZIONI ASSOLUTAMENTE ASETTICHE

Con queste esperienze si è cercato di controllare l'intensità dei processi di acidificazione quali si svolgono nell'interno di tessuti vegetali integri, e perciò sicuramente sterili, in modo da evitare l'impiego di qualsiasi anti-settico.

In una prima esperienza si impiegarono grossi steli di sorgo (*Sorghum Saccharatum*), privati delle foglie, ma lasciati integri e scelti in modo che non presentassero lesioni o screpolature. Si tagliarono in modo da avere un internodio ed i due nodi estremi e con questo materiale si allestirono le seguenti prove:

- 1° Steli in atmosfera di aria libera (recipiente aperto).
- 2° Steli in atmosfera di aria confinata (recipiente a chiusura idraulica).
- 3° Steli in atmosfera di anidride carbonica.
- 4° Steli in atmosfera di azoto.
- 5° Controllo, con steli finemente tagliuzzati ed accuratamente sistemati nel microsilo.

I cinque microsili vennero mantenuti in termostato a 37° per undici giorni. Quindi dagli steli delle singole prove si ricavò la parte interna, nella quale qualsiasi azione batterica era da ritenersi affatto esclusa. L'acidità iniziale del succo della parte centrale degli steli impiegati era espressa da pH = 5,35 e l'acidità libera di 10 cc del succo stesso equivalente a 0,8 cc di H₂SO₄ 0,1 N.

Al termine della conservazione si ebbero i seguenti risultati:

	pH	Acidità di 10 cc di succo cc 0,1 N
1° Steli in atmosfera di aria libera	5,4	0,8
2° Steli in atmosfera di aria confinata	4,9	1,7
3° Steli in atmosfera di CO ₂	5,4	0,9
4° Steli in atmosfera di azoto	6,3	0,5
5° Controllo: steli tagliuzzati	3,75	14,4

Nella prova 5^a venne anche accertato lo sviluppo, intensissimo, dei batteri acidificanti.

Per una maggiore attendibilità delle conclusioni le prove 2^a, 3^a e 4^a vennero ripetute con le stesse modalità e dopo 14 giorni di conservazione si ottennero i seguenti risultati:

	pH	Acidità di 10 cc di succo cc 0,1 N.
Valori iniziali	5,15	1,0
Steli in atmosfera d'aria confinata	5,25	1,2
Steli in atmosfera di CO ₂	6,2	0,55
Steli in atmosfera di azoto	5,3	0,7

I dati sovraesposti rivelano che mentre nella prova su steli tagliuzzati, e quindi non in condizioni di sterilità, si ebbe una intensa produzione di acidi, nell'interno degli steli mantenuti integri e perciò senza la presenza di microrganismi, l'incremento di acidità è stato assai lieve. Soltanto nella prova con aria confinata si è verificata una leggera diminuzione del pH, mentre in tutte le altre prove il valore medesimo si è mantenuto immutato od ha subito dei leggeri aumenti. È evidente pertanto che nelle precedenti condizioni di esperienza lo svolgersi dei processi dovuti alle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali ha dato origine a quantità di acidi affatto esigue. Ne deriva che l'elevata acidità prodottasi nella prova di controllo è, praticamente nella sua totalità, di origine batterica. Essa corrisponde a quella presente nei buoni insilati di mais e sorghi sfibrati; perciò è dato anche che gli zuccheri di questi foraggi sono contenuti per la maggior parte negli steli, è affatto logico ed attendibile concludere che l'acidificazione cui soggiacciono i foraggi medesimi è prevalentemente di natura batterica.

Un altro gruppo di esperienze in condizioni di assoluta sterilità venne compiuta operando con pianticelle di pisello e di mais ottenute per coltivazione assolutamente asettica.

Ecco la tecnica seguita:

I semi vennero trattati con soluzione di sublimato corrosivo al 5 per mille per 75-90'; quindi, con precauzioni atte ad evitare inquinamenti, essi vennero lavati con acqua sterile, passati in germinatoi previamente sterilizzati e mantenuti poi a temperatura ambiente, attendendosi la loro germinazione. Allorchè le radichette raggiunsero una lunghezza di 1-2 cm, i semi germinati vennero distribuiti, in numero di 8-10, entro piastre sterili in cui si era fatto solidificare dell'agar-malto, mantenendo poi in termostato a 30° per 2-3 giorni, al fine di controllare il risultato della sterilizzazione. Dopo di ciò i singoli semi germinati, sicuramente sterili, vennero introdotti in grosse provette di Roux, contenenti 10 cc di liquido di Knopp, previamente sterilizzate in autoclave; si lasciarono poi crescere le piantine alla luce sino a raggiungere il massimo sviluppo consentito dalle dimensioni delle provette.

Sempre con le dovute precauzioni, atte a mantenere la sterilità, le pianticelle vennero private delle radici, tagliate in 2-3 frammenti ed introdotte

in provette sterili. Una parte del materiale così preparato venne seminato con coltura pura di batteri acidificanti dei vegetali.

La conservazione venne effettuata in atmosfera di azoto, alla temperatura ambientale di 18-20°.

I risultati ottenuti dopo 25 giorni di conservazione sono i seguenti:

Determinazioni sul succo di spremitura	PISELLO			MAIS		
	Valori iniziali	Valori finali		Valori iniziali	Valori finali	
		Piantine sterili	Piantine più batteri acid.		Piantine sterili	Piantine più batteri acid.
pH	5,8	6	5,3	5,6	5,7	4,3
Zuccheri	presenza	presenza	assenza	4 ⁰ / ₁₀₀	5,5 ⁰ / ₁₀₀	assenza

Dai precedenti dati è agevole rilevare che le piantine sterili non subirono apprezzabili variazioni nel grado di acidità e nel contenuto zuccherino, mentre invece le piantine addizionate di batteri acidificanti soggiacquero a notevole acidificazione ed alla completa fermentazione degli zuccheri presenti. I risultati sono assai evidenti specialmente nell'esperienza con il mais e perciò è affatto lecito concludere in modo definitivo che l'acidificazione dei foraggi è dovuta principalmente ad azioni batteriche, mentre il concorso degli enzimi contenuti nelle cellule vegetali è da ritenersi assai esiguo.

CONCLUSIONI

Le sistematiche ricerche compiute presso questa Stazione intorno ai processi di acidificazione dei foraggi insilati hanno consentito di raccogliere un complesso di rilievi e di risultati che può essere così riassunto:

a) costante presenza nei foraggi conservati allo stato verde, mediante insilamento «a freddo», compresi quelli con aggiunta di acidi minerali, di un elevato numero di batteri acidificanti;

b) Rapido ed intensissimo sviluppo di codesti batteri nei primi giorni di fermentazione; dalle poche migliaia inizialmente presenti nel foraggio il loro numero aumenta ad oltre ½ miliardo per gr;

c) I succhi vegetali costituiscono un terreno elettivo per i batteri medesimi, che ne fermentano gli zuccheri con grandissima rapidità ed intensità, dando come prodotto principale acido lattico e, fra i prodotti secondari, acido acetico;

d) I batteri acidificanti dei foraggi insilati presentano un vasto potere fermentativo per tutti gli zuccheri vegetali ed utilizzano attivamente i pentosi ed i loro derivati; per contro essi sono scarsamente attivi sul lattosio, differenziandosi così nettamente dagli stréptococchi lattici e dai lattobacilli tipo bulgaricus, ritenuti in passato come i responsabili della fermentazione acida del silaggio;

e) Sopprimendo mediante sostanze microbicide di blanda azione la microflora acidificante, gli zuccheri contenuti nel foraggio non soggiacciono che ad una parziale ed esigua degradazione, mentre l'acidità non subisce che scarsi incrementi (esperienze I di questa nota).

f) Non è possibile usare soluzioni idrogliceriche per accertare lo svolgersi e l'intensità dei processi di acidificazione endocellulare a causa della notevole resistenza dei microbi acidificanti dei vegetali a tale sostanza.

g) Le quantità di acidi che si producono nell'interno di tessuti vegetali integri e sicuramente sterili (come nelle condizioni delle esperienze III di questa nota) è nulla od assai lieve.

In virtù di tutti questi rilievi l'ipotesi che gli acidi che si formano negli insilamenti a freddo siano prevalentemente d'origine endocellulare, traendo origine dalle attività fisiologiche ed enzimatiche delle cellule vegetali, non è accettabile; per contro le esperienze III di questa nota autorizzano a concludere in modo definitivo che *l'acidificazione dei foraggi insilati è dovuta per la massima parte ad azioni batteriche.*

RIASSUNTO

Le indagini descritte concernono gli agenti che presiedono ai processi di acidificazione dei foraggi insilati: alcune di esse sono state compiute mediante sterilizzazione chimica del foraggio, altre mediante prove di fermentazione in presenza di soluzioni idrogliceriche ed altre, con carattere definitivo, mediante l'impiego di vegetali fatti nascere e crescere sterilmente. È stato così dimostrato che l'acidificazione dei foraggi insilati è dovuta per la massima parte ad azioni batteriche, mentre assai scarso è il concorso degli enzimi contenuti nelle cellule vegetali.

ZUSAMMENFASSUNG

Die hier beschriebenen Untersuchungen betreffen die den Ansäuerungsprozessen im Silofutter vorstehenden Agentien; bei einigen derselben wurde das Futter chemisch sterilisiert, bei anderen wurden in Gegenwart von hydroglyzerischen Lösungen Gärungsproben ausgeführt und wieder andere, endgültige, wurden mit steril erhaltenen und gewachsenen Vegetalien angestellt. Es konnte somit festgestellt werden, dass die Ansäuerung im Silofutter zum grössten Teil auf einer bakteriellen Wirkung beruht, und dass die in den Pflanzenzellen enthaltenen Enzyme sehr spärlich daran beteiligt sind.

RÉSUMÉ

Ces recherches portent sur les agents qui président aux procès d'acidification des fourrages ensilés. Certaines d'entre elles ont été exécutées moyennant la stérilisation chimique du fourrage; les autres, moyennant des épreuves de fermentation en présence de solutions hydroglycériques et des autres

encore, à caractère définitif, moyennant l'emploi de végétaux faits naître et croître stérilement. On a démontré ainsi que l'acidification des fourrages ensilés est due pour la plupart à des actions bactériennes, tandis que le concours des enzymes contenus dans les cellules végétales est très limité.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *S. M. Babcock e H. L. Russell* - Die bei der Herstellung von Gärfutter (Silage) wirkenden Ursachen (Centr. f. Bakteriologie 1902, 9, pag. 81).
- (2) *A. R. Lamb* - The relative Influence of Microorganisms and Plant-Enzymes on the Fermentation of Corn Silage. (Journ. of Agric. Research. Washington, 1917, 8, pag. 361).
- (3) *S. H. Hansen* - I processi biochimici nell'insilamento dei foraggi verdi. (Norges Landbrukshoiskole, 25 Beritning, 1929, p. 58).
- (4) *B. Curin* - O puvodu kyseling mléčné v. silazi (Sbornic Vyzkumnych uslaver zemedelskych C.S.R., Praga 1932, 96).
- (5) *C. Arnaudi* - Ricerche sui microrganismi acidificanti dei foraggi insilati. (Atti R. Acc. dei Lincei, 1938, 28, pag. 157).
- (6) *I. Politi* - Sui processi fermentativi dei foraggi insilati allo stato verde. (Annali Sperim. Agraria, 1938, 29, pag. 89, 95).
- (7) *I. Politi* - Studio e riferimento sistematico dei batteri acidificanti dei foraggi insilati. (Questi Annali 1940, 1). (in corso di pubblicazione)
- (8) *U. Pratolongo* - L'infossamento dei foraggi - Aspetti biochimici e tecnici. (Atti R. Acc. dei Georgofili, 1939).
- (9) *U. Pratolongo e A. Fabris* - Il processo normale di acidificazione biochimica dei foraggi insilati. (Ann. del Lab. di ricerche sulle fermentazioni «L. Spallanzani», 1939, 5, pag. 149).
- (10) *Arnaudi C. et Politi I.* - Quelques observations à propos des procès d'acidification des fourrages ensilés. (Bollett. Sez. It. della Soc. Intern. di Microbiologia 1939, 11, pag. 217).

Ricerche sulla lievitazione panaria

Dott. Giovanni Pepoli

(Ricevuto il 25 Maggio 1940)

Fino dal 1938 vennero intraprese ricerche intese ad indagare le caratteristiche biologiche di diverse razze di lieviti che, per le loro proprietà fermentative si presentino particolarmente idonee all'impiego in panificazione.

Escluse le razze già in commercio per la panificazione, — un lievito compresso fra i più diffusi in Italia ci servi come termine di confronto — parve interessante rivolgere le nostre ricerche, ai fini dell'isolamento e dello studio delle razze suddette, sui lieviti provenienti dalla panificazione casalinga, quale si attua presso le nostre popolazioni rurali. Diversi campioni di lieviti casalinghi — provenienti da regioni diverse di pianura e di montagna — furono così esaminati: di essi si determinò l'acidità, inoltre si eseguirono conteggi microscopici e culturali per conoscere il numero di germi contenuti in questi lieviti casalinghi, nonchè le proporzioni fra schizomiceti e blastomiceti. I risultati di questi saggi — che sono già stati pubblicati (1) — si possono così riassumere: in tutti i lieviti casalinghi si riscontrarono delle acidità piuttosto alte, variando i valori del pH da un minimo di 3,8 a un massimo di 5,2, la maggioranza dei campioni presenta un pH intorno a 4,2. Il contenuto in germi si presenta elevatissimo al conteggio diretto: la maggioranza dei lieviti supera il miliardo di germi per grammo; la numerazione culturale ha dato invece dei risultati molto inferiori a quelli del conteggio diretto, il che sta ad indicare come moltissimi germi fossero già morti al momento di allestire le piastre.

Le percentuali di blastomiceti variano dal 2,5 al 10 % del totale, il che conferma la grande superiorità numerica degli schizomiceti nei lieviti casalinghi di pasta acida. Eseguiti numerosi isolamenti di blastomiceti, furono presi in particolare considerazione quelli che per le loro proprietà fermentative si dimostrarono adatti alle nostre ricerche, e di essi venne compiuta una prima selezione in base alla capacità di moltiplicazione e di fermentazione a bassa temperatura, venne cioè esaminato il loro comportamento a temperature di 25°-15°-10°-4° C.

Ai fini delle pratiche applicazioni, una lievitazione dell'impasto a temperatura più bassa (15-20° C.) di quella che attualmente viene usata, dovrebbe limitare gli effetti delle attività enzimatiche sul glutine.

Nella formazione dell'impasto da pane, il glutine acquista con l'idratazione particolari caratteristiche di coesione ed elasticità che per diverse cause vanno soggette a variazioni che influiscono sfavorevolmente sull'andamento della panificazione. Tra i fenomeni biochimici che intervengono nella panificazione a modificare i caratteri fisico-chimici delle proteine della farina, speciale importanza assumono i fenomeni di proteolisi che interessano le suddette proteine. È noto come la perdita di consistenza che si verifica negli impasti lasciati a sè nel tempo sia dovuta a una progressiva liquefazione del

glutine per cui risultano alterate le sue proprietà plastiche e quindi la tenacità ed elasticità dell'impasto. Questa demolizione glutinica è opera sia di un enzima o gruppo di enzimi presenti in misura diversa nei grani e nelle farine diverse — in minore quantità nei grani e nelle farine di « forza », in quantità maggiore nelle farine di « forza » scadente — sia di un gruppo di enzimi secreti dal lievito aggiunto agli impasti. Gli enzimi presenti nelle farine sono stati indagati da diversi autori: essi presentano i caratteri delle proteasi vegetali e la loro azione si svolge anche negli impasti aggiunti di antisettici indipendentemente cioè dalla presenza degli enzimi secreti dal lievito.

L'andamento enzimatico del fenomeno di liquidazione glutinica e il suo carattere proteasico sono stati messi in evidenza in Italia dall'Istituto di Chimica Agraria di Milano attraverso una serie di ricerche compiute da L. Salto (2-3) intese ad indagare le reazioni biochimiche che si svolgono negli impasti mantenuti sterili. Tali reazioni determinano accanto al processo di « collasso » fisico del glutine, una disintegrazione delle sostanze azotate costituenti il glutine stesso rilevabile attraverso un lieve incremento in acidi aminati e un incremento in fosforo inorganico. In impasti sterili, mantenuti a 25°, a quattro ore dall'inizio, l'Autore sopra citato ha rilevato con il micro-metodo al formolo mgr 0,55 di azoto aminico su 2 gr di impasto, che salgono a mgr 0,64 dopo 24 ore di permanenza a 25°.

All'azione delle proteasi della farina viene ad aggiungersi durante la fermentazione dell'impasto quella dovuta agli enzimi proteolitici secreti dai lieviti: questi enzimi sono costituiti da una proteasi, avente un comportamento analogo a quello della papaina, da una dipeptidasi, che attacca i dipeptidi e da una polipeptidasi che attacca i tripeptidi e polipeptidi.

Secondo Geoffroy e Labour (4) — i quali però sperimentarono su sospensioni di farina e non su impasti normali — l'azione delle proteasi del lievito sarebbe più rapida e più marcata dell'azione delle diastasi proteolitiche della farina.

Bailey e Olsen (5) studiando su sospensioni di farina la proteolisi causata dall'aggiunta di lievito, misero in evidenza incrementi in azoto « non proteico » col prolungarsi della fermentazione.

Johnson, Errington e Scott (6) sempre in sospensioni di farina rilevarono lieve incremento in acidi aminati dopo 24 ore di fermentazione.

A scopo di orientamento nello studio dell'azione dei lieviti sulle sostanze azotate della farina, vennero eseguite indagini su sospensioni di farina, onde accertare se le proteine della farina stessa soggiacciono a degradazione in seguito all'azione fermentativa del lievito. Le sospensioni vennero preparate in grossi provettoni sterili, impiegando 6 gr di farina, 60 cc di acqua distillata sterile e 3 gr di lievito centrifugato, avente un'umidità del 77,5 %. Vennero così provati diversi ceppi di lieviti alla temperatura di 20° C. e per ogni prova si allestirono due controlli, cioè: un controllo di sola farina ed acqua ed un controllo di solo lievito ed acqua, entrambi nelle proporzioni della rispettiva prova. Dopo 4 e 20 ore dall'inizio di ogni prova si prelevarono sterilmente dai due controlli e dalla semina 25 cc di sospensione che si sottoposero a centrifugazione e quindi a filtrazione fino ad ottenere un liquido limpidissimo. Su questo liquido si determinò l'azoto aminico mediante il microme-

todo al formolo di Sørensen, nella modificazione di Brown. I risultati di queste prove sono esposti nella pubblicazione già citata (1); in generale le determinazioni hanno dato esito positivo, nel senso che in quasi tutte le prove si sono riscontrati degli incrementi in aminoacidi dovuti ad una azione proteolitica del lievito. Nella determinazione eseguita a quattro ore dall'inizio dell'esperienza, questi incrementi risultano nulli per tre ceppi, sui dodici provati, mentre per gli altri ceppi si hanno incrementi in azoto aminico che vanno dal 0,34 all'1,54% dell'azoto totale della farina. Nella determinazione eseguita a 20 ore dall'inizio dell'esperienza, gli incrementi in azoto aminico risultano ancora nulli per un ceppo, mentre per tutti gli altri si hanno ulteriori aumenti in azoto aminico, che vanno da 0,98 al 7% dell'azoto totale della farina.

CONFRONTO DEL POTERE FERMENTATIVO DI CEPPI DIVERSI A 15° E 25° C.

I diversi ceppi di blastomiceti vennero sottoposti ad una prova di fermentazione per confrontare il potere fermentativo di questi a due diverse temperature e cioè a 15° e 25° C. Per queste prove siamo ricorsi alla valutazione ponderale dell'anidride carbonica prodotta nel corso della fermentazione di un liquido della seguente composizione:

Acqua di fonte	gr 1000
Peptone neutro	» 10
Maltosio	» 10 pH 6,25
Glucosio	» 10
Fosfato monopotassico	» 3
Solfato di magnesio	» 2

La concentrazione zuccherina del liquido impiegato venne portata al 2% con quantità eguali di glucosio e maltosio, allo scopo di agire in condizioni non troppo discoste da quelle che si hanno negli impasti; infatti nelle farine si trovano degli zuccheri rapidamente fermentescibili nella proporzione dell'1 al 2%, ai quali viene ad aggiungersi il maltosio formato per azione dell'amilasi, in proporzioni variabili dall'1,5 al 2,5%. Per ogni prova vennero seminati gr 2 di lievito centrifugato (umidità 77%) in 110 cc di liquido zuccherino: il tutto in un piccolo Enlenmayer chiuso con tappo di gomma munito di valvola ad acido solforico. Pesati esattamente, i due matracci con lo stesso ceppo di lievito vennero posti uno a 15° e uno a 25° e mediante pesate a intervalli eguali di tempo (ogni 24 ore) si determinò l'anidride carbonica prodotta e ciò fino a fermentazione ultimata.

I risultati di alcune di queste prove sono riassunti nella Tab. I.

Abbiamo anche voluto provare un ceppo di *Cerevisiae* basso della nostra collezione, che nella Tabella figura accanto agli altri ceppi. Nella fermentazione a 15° e a 25° un solo ceppo si dimostra inferiore a quello isolato dal lievito compresso: il 16 b, tutti gli altri si dimostrano superiori. Da notare come il *Cerevisiae* si stacchi nettamente da tutti gli altri per la sua forte fermentazione. I risultati rivelano il diverso potere fermentativo nel tempo dei ceppi in esame: le differenze risultano tanto più importanti ai fini delle pratiche applicazioni, quanto più presto si rivelano dall'inizio della fermentazione.

TABELLA I
FERMENTAZIONE A 15° C.

Tempi	Ceppi							Cerevisiae
	C	4 b	7	9 f	12	16 b	X	
8 ore	—	—	—	—	—	—	—	—
16 »	—	—	—	—	—	—	—	—
18 »	—	—	—	—	—	15	—	—
1 giorno	190	202	430	210	210	40	365	810
2 giorni	415	437	545	410	450	210	500	1355
3 »	590	560	580	530	590	310	560	1670
4 »	665	607	600	640	650	385	565	1790
5 »	—	—	—	—	—	435	—	—
6 »	—	—	—	—	—	—	—	—
7 »	—	—	—	—	—	—	—	—

FERMENTAZIONE A 25° C.

8 ore	—	—	—	—	—	—	—	—
16 »	—	—	—	—	—	—	—	—
18 »	—	—	—	—	—	370	—	—
1 giorno	495	700	740	590	660	435	720	1910
2 giorni.	630	760	760	800	760	555	750	2300
3 »	670	790	770	810	810	600	775	2405
4 »	690	800	780	820	820	630	790	2440
5 »	—	—	—	—	—	640	—	—
6 »	—	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—	—

PROVE DI FERMENTAZIONE SU SOSPENSIONI DI FARINA

Una nuova serie di prove di fermentazione su sospensioni di farina venne allestita allo scopo di saggiare l'andamento del potere fermentativo dei diversi ceppi di lieviti a 15° e 25° C.

Abolita la farina miscelata in vigore durante la precedente sperimentazione, venne usata la normale farina per panificazione adoperata dai fornai.

Tutti i recipienti adoperati, matracci, pipette ecc. nonchè l'acqua vennero preventivamente sterilizzati. La farina invece non subì alcun trattamento di sterilizzazione, tenuto conto dell'esiguo numero di germi contenuto in essa — poco più di 10.000 per gr — e delle difficoltà cui si va incontro per avere una sterilizzazione sicura senza alterare i caratteri fondamentali della farina stessa.

Le sospensioni vennero preparate in recipienti della capacità di circa 65 cc nei quali, al momento dell'esperienza, si introducevano 12,5 grammi di farina e agitando 50 cc di acqua distillata sterile contenente gr 0,5 di lievito in precedenza centrifugato. Quindi la farina veniva a trovarsi nella proporzione del 25% rispetto all'acqua ed il lievito (umidità 77 %) nella proporzione del 4% rispetto alla farina. Il recipiente venne collegato mediante un corto tubo di gomma ad una pipetta graduata contenuta in un cilindro pieno di olio di vaselina. L'anidride carbonica sviluppantesi durante la fermentazione spostava l'olio di vaselina contenuto nella pipetta: si riportava quindi l'interno del cilindro alla pressione atmosferica abbassando il cilindro

fino ad agguagliare il livello dell'olio in esso contenuto con quello della pipetta.

Le prove vennero eseguite per ogni ceppo di lievito contemporaneamente a due temperature mediante due apparecchi eguali posti, uno in termostato a 25° e uno in refrigerante ad acqua a 15° C. Per ogni prova vennero controllati l'inizio della fermentazione e lo svolgimento di CO₂, nel tempo.

Nella Tab. II sono riportati i dati in cc di CO₂, ottenuti per alcuni ceppi in esame.

Nel corso della fermentazione, i ceppi 16 b, 17, X si rivelano i più attivi, confermando i risultati delle precedenti prove di fermentazione su sospensioni di farina. D'altra parte gli stessi ceppi si dimostreranno i più attivi fermentatori anche negli impasti normali.

PROVE DI FERMENTAZIONE SU IMPASTI NORMALI

Allo scopo di saggiare l'andamento del potere fermentativo dei ceppi di lieviti in esame su impasti normali vennero allestite delle prove di fermentazione a diverse temperature.

Una prima serie di queste prove fu eseguita a 40° C. di temperatura: gli impasti vennero preparati con gr 300 di farina normale di panificazione, 150 cc di acqua distillata e gr. 4,5 di lievito centrifugato.

La farina, l'acqua e tutti i recipienti adoperati erano posti in termostato a 40° C. due ore prima di iniziare la lavorazione. Le culture dei lieviti furono ottenute insemenzando quantità variabili di infuso di malto e mettendo a sviluppare a 25° arieggiando di tempo in tempo mediante agitazione. Dopo 5 giorni si decantò il liquido limpido sovrastante e si centrifugò il resto. Al momento di iniziare la preparazione dell'impasto, dopo aver pesato la quantità voluta di lievito, se ne preparava una sospensione nell'acqua a 40° e si procedeva alla sua incorporazione nella farina. La lavorazione degli impasti — sempre fatta a mano — durò 20', dopo di che l'impasto era sistemato nel cilindro graduato della capacità di 2000 cc tolto al momento dal termostato. Dopo aver immerso nella massa un termometro sensibile per il controllo della temperatura, il cilindro veniva posto nel termostato. A partire da questo momento venivano calcolati i tempi di controllo. Ogni 15' e per la durata di due ore si segnava l'aumento di volume dell'impasto. Si provarono così alcuni dei ceppi in esame: i risultati sono riassunti nella Tab. III.

È da notare che dopo due ore di permanenza a 40° C. la maggior parte degli impasti aveva raggiunto il suo massimo volume. Gli incrementi totali di volume degli impasti, alla fine delle due ore di prova, non differiscono di molto fra di loro; negli impasti eseguiti con i ceppi 2 b, 8 a, 1 a, *Cerevisiae* si notano incrementi totali inferiori agli altri.

Fra ceppo e ceppo si scorgono invece differenze piuttosto notevoli nei tempi intermedi del controllo: ad un'ora dall'inizio, per esempio, il ceppo C (compresso del commercio) aveva dato all'impasto un incremento di volume di 340 cc mentre il ceppo 17 ne dava 470 il ceppo X ed il ceppo 16 b 450, il ceppo 7 440 cc. Differenze queste che potrebbero assumere speciale importanza ai fini delle pratiche applicazioni.

Alla medesima temperatura furono anche eseguite, con alcuni degli

TABELLA II
FERMENTAZIONE SU SOSPENSIONI DI FARINA

a 25° C.

a 15° C.

Ceppi	Inizio ferment. dopo ore:	Produzione di CO ₂		Ceppi	Inizio ferment. dopo ore:	Produzione di CO ₂					
		dopo ore	cc			dopo ore	cc				
1 a	1,45'	2,15	1,1	1 a	3,45	5,15	0,4				
		3,15	7,1			6,15	1,5				
		4,30	11,5			6,45	2,2				
		5,40	16,2			7,15	3,3				
		6,45	18,2			8,15	5				
		7,45	21,3			8,45	5,4				
		8,45	24								
		10,45	27,3								
		C	1,15'			2,30	2,5	C	4,30'	5	0,5
						3	6,9			6,30	2,1
3,45	9,5			7	3						
4,30	10,5			8	4						
5,30	14,5			9	5						
6,30	16,5										
8	19,1										
10	22,1										
7	1			1,45	1,3	7	3,20			4,20	1,3
				2,15	4,3					5,20	3
		3	8,5	5,50	4						
		4,45	12,6	6,20	5,1						
		5,45	16,3	6,50	6						
		6,45	20,4	7,20	7						
		7,45	24,1	7,50	8						
		8,45	27,4	8,20	8,5						
		10,45	33,1								
		<i>Cerevisiae</i>	0,50'	1,50	1,1			<i>Cerevisiae</i>	2,20	3,20	1
2,20	4			3,50	1,2						
2,50	6,5			4,20	2,6						
3,50	8,2			4,50	3,5						
4,50	8,9			5,20	4,4						
5,50	9,6			5,50	5,1						
6,20	9,8			6,20	5,8						
9,50	10,6			9,50	7						
16 b	0,40'			1,40	1,3	16 b	4,45'			5,10	0,7
				2,15	4,6					5,50	1,3
		2,40	9,1	6,20	3						
		3,50	16,1	6,40	3,7						
		4,45	22,9	8,20	5,1						
		5,50	31	9	5,9						
		6,35	36,5	9,50	6,3						
		7,50	42,7	10,20	7,1						
		X	0,55	1,45	1,8			X	2,10	4	1
				2,30	5,8					5	2,6
3	8,2			5,50	4						
4,30	10,3			6,10	5,5						
5,30	13,3			6,40	7						
6,30	16,8			8,10	8						
7,30	19,8			8,40	10,4						
8,45	23,6			10,20	12,1						
17	1,10			2,25	0,5	17	3,50			5,50	0,5
				3,20	2,8					6,50	1,3
		4,20	4	7,30	2						
		5,20	5,2	8	2,8						
		6,20	7,5	8,50	4,2						
		7,30	10,7	9,20	5,5						
		8,50	13,3	10,20	6,5						
		9,20	14,7								
		10,20	16,5								

TABELLA III
IMPASTI IN CILINDRO GRADUATO A T = 40° C.

Ceppi	Tempi di controllo e incrementi di volume in cc.							
	0,15'	0,30'	0,45'	1h	1,15'	1,30'	1,45'	2h
1 a	70	140	270	420	520	560	590	600
2 b	20	40	100	170	210	250	340	420
3	60	120	200	300	390	460	480	500
7	80	180	340	440	540	570	580	600
8 a	40	120	200	320	430	500	510	520
10 a	60	160	290	390	480	490	510	530
16 b	90	170	310	450	540	590	620	620
17	70	160	310	470	560	600	620	630
L.P.	60	180	300	440	540	580	600	620
X	80	240	340	450	520	540	580	580
C	70	130	210	340	440	540	580	620
<i>Cerevisiae</i>	20	60	120	160	220	240	280	340

stessi ceppi, delle prove in doppio, con aggiunta di amilodiastasi da *Aspergillus oryzae*. Gli impasti erano preparati contemporaneamente, nelle condizioni e con le modalità della prova precedente, solo che in uno di essi si aggiungeva una quantità di amilasi nella proporzione di 1/10.000 del peso della farina impiegata.

I risultati di queste prove sono esposti nella Tab. IV.

TABELLA IV
IMPASTI IN CILINDRI GRADUATI A T = 40° C.
PROVE IN DOPPIO CON AGGIUNTA DI AMILODIASTASI

Ceppi	Tempi di controllo e incrementi di volume in cc.							
	0,15'	0,30'	0,45'	1h	1,15'	1,30'	1,45'	2h
2f	40	160	280	400	520	560	600	600
2f+amilasi	40	140	220	320	500	610	700	700
7	80	180	340	400	540	570	580	600
7+amilasi	80	180	360	500	640	720	740	760
16b	90	170	310	450	540	590	620	620
16b+amilasi	120	200	350	510	640	720	740	750
17	70	160	310	470	560	600	620	630
17+amilasi	60	170	340	480	640	720	720	750
X	80	240	340	450	520	540	580	580
X+amilasi	80	240	340	480	600	630	680	690
C	70	130	210	340	440	540	580	620
C+amilasi	90	160	250	380	510	620	700	700
9f	60	150	280	420	530	600	620	640
9f+amilasi	70	170	300	450	560	640	680	720
<i>Cerevisiae</i>	20	60	120	160	220	240	280	340
Cer.+amilasi	20	60	100	140	180	280	340	370

Da essi risulta che i ceppi che si dimostrarono più pronti utilizzatori degli zuccheri formati per azione dell'amilasi aggiunta, sono i ceppi 16 b, 17, 7, X, quelli cioè che anche nella prova precedente mostrarono di essere i più attivi nella fermentazione degli impasti.

Una serie di prove venne infine eseguita a temperatura ambiente, sperimentando gli stessi ceppi di lievito e per ogni ceppo si fece una prova in doppio, mediante aggiunta di amilodiasiasi.

L'escursione massima della temperatura durante le vane prove fu di 4 - 4,5° C., variando da 17,5° a 22° C.

Gli impasti vennero preparati con le stesse modalità delle prove precedenti, naturalmente tutti gli ingredienti adoperati erano tenuti all'ambiente. Gli impasti si confezionarono al mattino e dopo averli sistemati nei cilindri graduati, si lasciarono lievitare finchè si notò un apprezzabile incremento, prendendo nota di 30' in 30' dell'aumento di volume. In generale la lievitazione non progrediva oltre le 7 ore dall'inizio. A questo punto, estratti gli impasti dai cilindri si aggiunse a ciascuno di essi 50 gr di farina mediante manipolazione che durò 15', dopochè si ricollocarono nei cilindri per una seconda lievitazione. Questa seconda lievitazione fu molto più rapida della prima, la lavorazione arieggiando la massa e favorendo la rapida moltiplicazione dei lieviti, che trovavano nuovo alimento nella farina immessa nell'impasto. In questa seconda fermentazione si raggiunse il massimo incremento di volume in un periodo variante da 2 a 3 ore.

I risultati di questa prova sono esposti nella Tab. V.

Per quanto riguarda le variazioni di temperatura verificatesi fra prova e prova, notiamo che le lievitazioni con i ceppi 9 f e 7 si iniziarono a 17,5° raggiungendo verso la fine i 19° C.; le lievitazioni con i ceppi 16 b, 17, 10 a, e *Cerevisiae* si svolsero a 19°; quella con il ceppo C a 21° e quella con il ceppo 1 a a 22° C.

In questa fermentazione a temperatura ambiente, il ceppo X è uno dei più attivi, il suo impasto dopo tre ore dà un incremento di volume di 490 cc, seguono il ceppo 2 f con 430 cc, il ceppo 10 a con 370, il ceppo 16 b con 280, il ceppo 17 con 250 cc mentre l'impasto col ceppo C dà appena 160 cc di incremento.

Per quanto riguarda l'aggiunta di amilasi, le differenze più notevoli fra prova in bianco e quella con l'enzima si notano ancora con i ceppi 17, 16 b, 7 e 10 a.

DI ALCUNE PROVE PRATICHE DI PANIFICAZIONE

A scopo di orientamento per le prossime prove di panificazione che saranno eseguite in collaborazione con la Stazione Sperimentale di Riscicoltura di Vercelli, furono compiute alcune prove di panificazione adoperando come lieviti uno dei ceppi da noi isolati e precisamente il ceppo 7 e un ceppo *Cerevisiae* basso proveniente dalla nostra collezione.

Con questi due ceppi di lievito vennero preparati contemporaneamente due impasti al mattino e due impasti alla sera.

Gli impasti preparati al mattino erano costituiti da gr 300 di farina, gr 150 di acqua, gr 3 di lievito centrifugato, gr 2,1 di sale. Gli impasti, lavo-

TABELLA V

IMPASTI IN CILINDRI GRADUATI A TEMPERATURA AMBIENTE
PROVE IN DOPIO CON AGGIUNTA DI AMILODIASTASI

Tempi	Ceppi di lieviti e relativi incrementi di volume in cc.																				
	1 a	1 a	2 f	2 f	7	7	9 f	9 f	10 a	10 a	16 b	16 b	17	17	X	X	C	C	Cerev.	Cerev.	
	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.	amil.
0,15'	10	10	30	30	—	—	10	10	20	20	10	10	20	20	40	40	10	10	—	—	
0,30'	20	20	40	40	10	30	20	20	30	30	30	30	40	10	30	50	10	20	20	10	
1h	30	40	90	90	30	50	30	40	50	70	40	70	30	70	130	150	30	40	40	30	
1,30'	50	80	150	150	50	90	30	40	110	130	80	120	70	160	230	250	50	50	50	50	
2h	90	110	230	230	70	130	70	60	190	230	120	200	110	210	350	350	90	70	70	70	
2,30'	110	160	340	340	130	230	110	100	270	310	200	280	180	300	410	410	130	110	100	100	
3h	160	210	430	440	180	280	160	150	370	410	280	380	250	390	490	510	160	150	140	140	
3,30'	210	270	480	510	250	360	230	220	430	550	360	440	340	510	550	550	240	210	170	170	
4h	280	340	500	550	320	450	290	280	490	600	420	520	410	550	520	580	310	270	210	220	
4,30'	350	420	500	590	390	520	350	340	500	600	480	560	480	570	540	600	370	340	270	270	
5h	430	500	530	630	460	530	400	420	510	630	500	560	500	580	550	580	430	420	310	320	
5,30'	490	560	570	640	480	550	440	490	520	650	520	590	510	620	540	610	460	510	370	370	
6h	510	550	590	650	480	550	450	530	540	670	550	610	510	640	570	630	470	530	410	410	
6,30'	530	580	—	660	510	570	450	550	670	—	540	640	550	640	550	650	—	—	440	450	
7h	540	610	—	—	—	—	—	—	—	—	570	640	550	680	580	630	—	—	460	480	
si eseguisce una seconda lavorazione degli impasti aggiungendo gr 50 di farina ciascuno.																					
0,15'	120	160	130	190	80	110	110	100	140	200	110	150	200	280	80	110	—	—	—	—	
0,30'	180	240	190	320	200	250	280	240	280	380	200	240	370	480	160	200	210	200	50	40	
1h	450	560	270	480	320	380	420	400	420	600	400	430	480	600	280	340	380	360	80	60	
1,30'	540	660	340	540	460	540	480	510	460	640	500	580	630	630	420	490	480	500	110	100	
2h	560	680	400	600	500	600	500	600	660	660	540	640	540	540	460	550	500	640	140	120	
2,30'	580	690	440	—	520	620	—	—	480	660	540	660	540	650	520	580	—	—	—	—	
3h	—	—	460	—	540	640	—	—	480	660	540	660	540	650	—	—	—	—	—	—	

rati a mano per 20', vennero lasciati lievitare all'ambiente ($T = 20^{\circ} \text{C.}$) sottoponendoli ogni due ore ad una successiva manipolazione per la durata di 10'. La fermentazione dell'impasto col lievito 7 si mostrò più rapida e la pasta giunse al punto ottimo di maturazione un'ora prima di quella con il *Cerevisiae*. Quindi i due impasti vennero suddivisi dal fornaio in pani di grandezza normale e sottoposti a cottura in forno elettrico. La temperatura del forno era di 260° e la cottura durò 25'. In seguito confrontammo i caratteri organolettici dei pani provenienti dai due impasti diversi, fra di loro e con quelli dei pani provenienti dalla lavorazione del fornaio. Nel pane proveniente dall'impasto con il ceppo 7, la crosta si presenta con un bel colore lucido e la sua superficie a tessitura molto più fine di quella del pane di confronto. La mollica è bianchissima, per quanto un po' meno spugnosa di quella del pane di confronto. Infine il sapore è gradevolissimo al palato e questi pani conservano la freschezza molto più a lungo di quelli di confronto.

I caratteri dei pani provenienti dall'impasto con il *Cerevisiae* sono simili ai precedenti, per quanto un po' attenuati.

Gli impasti preparati alla sera con gli stessi due lieviti ebbero le seguenti proporzioni: farina gr 300, acqua gr 180, lievito gr 3, sale gr 2,1. La percentuale d'acqua è stata portata qui al 60% della farina, mentre nella prova precedente era del 50%. La percentuale del lievito è sempre dell'1% mentre quella usata dal fornaio è dell'1,5. Preparati gli impasti alla sera, vennero lasciati lievitare fino al mattino successivo (circa 12 ore) sempre alla temperatura ambiente del laboratorio (20°C.). Al mattino si aggiunsero 25 gr di farina a ciascuno degli impasti e si lasciarono lievitare ancora per tre ore, dopo di che si formarono i pani e si misero nel forno.

I caratteri organolettici di questi pani dopo cottura sono molto simili a quelli dei pani del fornaio: la crosta presenta lo stesso colore e lo stesso aspetto, la mollica la stessa porosità, ma non ha più la bianchezza di quella della prova precedente. Anche la serbevolezza del pane ha una durata molto minore di quella del pane della precedente prova.

Senza avere la pretesa di stabilire dei paragoni definitivi, che saranno possibili solo quando si potranno eseguire numerose altre prove, corredate da tutte quelle misurazioni di ordine fisico-chimico che sono necessarie sul pane dopo cottura, i confronti eseguiti sono interessanti poichè dimostrano ancora una volta quale importanza abbiano la scelta di un buon stipite di lievito, nonchè la questione dell'assorbimento della farina e quella della lavorazione della pasta e quale influenza esse possono esplicare sui caratteri del pane.

Una sperimentazione continua e razionale potrà portare a quei miglioramenti che sono desiderabili per la panificazione italiana.

RIASSUNTO

Numerosi stipiti di blastomiceti vengono isolati da diversi campioni di lieviti provenienti dalla panificazione casalinga. Di alcuni di questi ceppi viene saggiato il potere fermentativo su sospensioni di farina da panificazione e su impasti di consistenza normale, a 40°C. di temperatura e a temperatura ambiente (18° - 22°C.), allestendo delle prove in doppio con aggiunta di amilodiastasi.

Vengono infine eseguite delle prove preliminari di panificazione adoperando uno dei lieviti isolati e confrontando i caratteri organolettici dei pani dopo cottura con quelli dei pani provenienti dalla lavorazione del fornaio.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus verschiedenen Hefeproben der Hausbäckerei werden zahlreiche Blastomycetenstämme isoliert. Es wird bei einigen derselben das Gärungsvermögen an Brotmehl-Suspensionen sowie an normal starkem Teige, bei 40° C und bei Zimmertemperatur (18°-22° C), geprüft und es werden auch Doppelproben mit Amylodiastasezusatz angelegt.

Schliesslich macht man Vorversuche, in denen bei der Brotbereitung eine der isolierten Hefen Anwendung findet, und die organolettischen Merkmale des gebackenen Brotes mit denjenigen des aus der Bäckerei kommenden Brotes verglichen werden.

RÉSUMÉ

De plusieurs échantillons de levure provenant de la panification casanière, on a isolé de nombreuses souches de blastomycètes. Quelques unes de ces souches ont été éprouvées par rapport à leur pouvoir de fermentation, sur des suspensions de farine à panification et sur des pâtes à consistance normale, à 40° C. de température et à température ambiante (18°-22° C), en apprêtant des épreuves doubles avec addition d'amylo-diastase.

On a exécuté enfin des épreuves préliminaires de panification en employant une des levures isolées et on a comparé les caractères organoleptiques des pains après la cuisson, avec ceux des pains provenant du boulanger.

BIBLIOGRAFIA

- (1) *Pepoli G.* - Ricerche sulla fermentazione panaria. «Zymologica Chimica dei colloidi», Anno XV, Bologna, Giugno 1939 XVII, N. 1-3.
- (2) *Salto L.* - Ricerche biochimiche sulle farine e sugli impasti da pane. Annali del Laboratorio di Ricerche sulle fermentazioni L. Spallanzani, 1937. Vol. 4, pp. 29-215.
- (3) — Ricerche biochimiche sopra la trasformazione del glutine negli impasti da pane. Annali del Laboratorio di Ricerche sulle fermentazioni L. Spallanzani, 1939 XVII. Vol. 5.
- (4) *Geoffroy R. e Labour G.* — Action des diastases protéolytiques sur les protéines des farines de froment. «Bull. Soc. Chim. Biol.», 1934. T. 16.
- (5) *Bailey C. and Olsen A.* - A study of the protease of bread yeast. «Cereal. Chemistry», 1925.
- (6) *Johnson, Herrington and Scott* - «Wheat and flour studies», 1929.
- (7) *Borasio L.* - Méthodes d'analyses et d'appréciation du blé, des farines et du pain etc. - Extrait «Bull. de Rens. tecn.», 1935-1936.
- (8) *Guillemet R.* - Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique. La fermentation panaria. Lons Le Saunier, 1936.
- (9) *Boutroux* - Le paine et la panification. Paris, 1887.

L'acetil-metil-carbinolo nei foraggi insilati

Luigi Piazza

(Ricevuto l'11-7-1940).

Sulla presenza dell'acetil-metil-carbinolo nei foraggi insilati non mi risulta sia stata compiuta sino ad ora alcuna indagine. Mi sono occupato di questo argomento, per consiglio del Prof. Antoniani, in vista dell'importanza che una simile indagine può avere come contributo alla conoscenza dei processi fermentativi che si svolgono in seno ai foraggi conservati in silos. A prescindere dalle condizioni particolari che si richiedono per il suo accumulo in copia, è noto che l'acetoina si forma in quasi tutti i processi di degradazione glucidica. La sua formazione venne attribuita da Neuberg e Hirsch (1) ad un enzima designato col nome di *carbologasi*, cui spetterebbe la funzione di determinare la saldatura di due molecole di aldeide acetica conformemente allo schema:



dando luogo, in altri termini, ad un processo di resintesi che verrebbe ad inserirsi sul processo di degradazione della molecola di zucchero in corrispondenza della tappa quasi finale in cui si ha la formazione dell'aldeide acetica.

Neuberg e Hirsch (2) hanno riscontrato la presenza della *carbologasi* in tutti i lieviti sia di fermentazione alta che di fermentazione bassa da loro indagati. L'enzima è pure presente ed attivo nei preparati secchi di lievito nonché nei suoi estratti di macerazione. T. Kitasato (3) ha dimostrato che anche i batteri acetificanti (*B. ascendens*) sono in grado di provocare la condensazione acetoinica.

Del pari numerosi sono i substrati da cui può procedere la formazione dell'acetoina. Oltre ai tipici zuccheri fermentescibili vi si possono annoverare tutte le sostanze ternarie la cui demolizione enzimatica passi per lo stadio intermedio obbligato dell'aldeide acetica. C. Antoniani (4) ha riscontrato la formazione di acetoina anche nella fermentazione dell'acido glicerico da parte del *B. coli* e del *B. lactis aerogenes*.

Ciò che più importa di rilevare agli effetti della presente indagine, è lo stretto legame di conseguenza che esiste tra formazione di acetoina e fermentazione glucidica. Non può aversi formazione di acetoina se non vi sia contemporanea demolizione fermentativa dello zucchero sino allo stadio dell'aldeide acetica. Il fatto della presenza del cheto-alcool è quindi in certa guisa una garanzia di permanenza dell'insieme di condizioni che sono favorevoli allo svolgimento di un processo di fermentazione glucidica; di un processo cioè che è senza dubbio il miglior parametro di misura della buona riuscita di un silos.

I rilievi analitici che ho avuto modo di compiere sin qui, e di cui riferisco in questa comunicazione preliminare, mi sembra costituiscano una conferma di questo modo di vedere.

Dei dieci campioni di foraggio insilati da me presi in esame, nove erano in buone condizioni di conservazione, ed in essi l'acetoina è stata riscontrata presente senza eccezione, in quantità variabili (nei 20 cc di estratto su cui operavo) da un minimo di tracce ad un massimo di 19,2 milligrammi. Nel campione di foraggio N. 5, di favetta - orzella, mal conservato e con evidente microflora putridogena, non riscontrai presenza di acetoina neppure in tracce.

Può l'entità del contenuto in acetoina di un foraggio insilato essere presa a misura della buona riuscita dell'insilamento? I dati da me ottenuti sinora non consentono certo di rispondere a questa domanda, ma una simile correlazione non può essere esclusa a priori. Non fosse altro, la inserzione di un processo di resintesi acetoinica, per sè e per il suo valore indiziaro di sintesi più ampie, rappresenta sempre per il foraggio in conservazione un riguadagno di valore nutritivo, o quanto meno un freno alle perdite che si hanno quando la degradazione glucidica proceda ininterrotta sino alla sua tappa estrema.

PARTE SPERIMENTALE

I campioni di foraggio vennero prelevati personalmente da me dai rispettivi silos. Il prelevamento venne effettuato sia al centro della massa insilata che alla periferia di essa, sempre però limitatamente allo strato immediatamente sottostante alla superficie.

Ogni campione risultava di circa Kg. 3 di foraggio. Esso veniva accuratamente trinciato con l'ausilio di un piccolo trinciaforaggi e dalla massa omogenea trinciata si preparava un secondo campione di un chilogrammo, destinato all'analisi. Quest'ultimo veniva sottoposto in toto a spremitura in pic-

RISULTATI

Foraggi	Durata dell'insilamento	Estratto ottenuto (cc)	Acetoina in 20 cc di estr. (mg)	Acetoina per kg di foraggio (mg)
1) medica - trifoglio - avena.	mesi 11	436	9,6	209,2
2) medica - trifoglio - granturchetto.	» 11	145	19,2	139,2
3) favetta - orzella.	» 10	368	16,2	298,0
4) sulla - medica - avena.	» 11	270	tracce	
5) favetta - orzella.	» 11	420	assenza	
6) medica - paglia.	» 11	268	17,4	233,1
7) medica.	» 11	278	tracce	
8) granturchetto - grapi d'uva.	» 6	352	12,6	221,7
9) medica - granturchetto - vinaccia.	» 6	250	tracce	
10) medica - lupinella.	» 11	320	12,0	192,0

colo torchio da laboratorio, l'estratto da esso ottenuto veniva in seguito ripetutamente filtrato sino a limpidezza.

La determinazione del contenuto in acetoina si eseguiva su una parte aliquota dell'estratto (20 cc) secondo il metodo di Lemoigne (5) nella modificazione di van Niel (6).

RIASSUNTO

L'A., in vista dell'importanza che la ricerca dell'acetil-metil-carbinolo potrebbe avere sulla conoscenza dei processi fermentativi nei foraggi insilati, ha preso in esame dieci campioni di tali foraggi, eseguendo la determinazione del contenuto in acetoina, secondo il metodo di Lemoigne modificato da van Niel.

Su nove di essi ha riscontrato presenza di acetoina in quantità variabili (nei 20 cc. di estratto su cui operava) da un minimo di tracce ad un massimo di mg 19,2. In un solo campione, mal conservato, ha rilevato assenza completa di acetoina.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Bedeutung die dem Nachweis des Acetyl-methyl-carbonil's zur Kenntniss der Gärungsprozesse im Silofutter zukommen könnte, hat Verf. bei 10 Proben von solchem Futter den Acetoingehalt bestimmt, wobei er sich der nach Van Niel abgeänderten Methode von Lemoigne bediente.

Bei 9 von diesen Proben war das Acetoin (in den 20 cc. Extrakt die zur Probe dienten) in Mengen nachweisbar, welche zwischen einem Mindestgehalt von ganz geringen Spuren und einem maximalen von 19,2 mg. schwankten. In einer einzigen, schlecht konservierten Probe war das Acetoin gänzlich abwesend.

RÉSUMÉ

En vue de l'importance que la recherche de l'acétal-méthyl-carbonile pourrait avoir pour l'étude des procès de fermentation des fourrages ensilés, l'A. a pris en examen 10 échantillons de ces fourrages et a exécuté la détermination du contenu en acétoïne, suivant la méthode de Lemoigne, modifiée par van Niel.

Chez 9 d'eux, il a relevé la présence d'acétoïne en quantités variables (pour les 20 cc. d'extrait en examen) d'un minimum de traces, à un maximum de 19.2 mgr.

Chez un seul échantillon, mal conservé, l'A. a constaté la complète absence d'acétoïne.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Bioch. Zeitschr. 115, 282; 1921.
- (2) L; c.
- (3) Bioch. Zeitschr. 195, 118; 1928.
- (4) Idem. 267, 380; 1933.
- (5) Chem. Zentralbl. IV - 734; 1920.
- (6) Bioch. Zeitschr. 187, 472; 1927.

