

ANNALI DI MICROBIOLOGIA

MEMORIE DI MICROBIOLOGIA GENERALE ED APPLICATA ALLA
AGRICOLTURA, ALLE INDUSTRIE FERMENTATIVE ED ALIMENTARI; DI
ENZIMOLOGIA E CHIMICA DELLE FERMENTAZIONI NEI LORO
RAPPORTI CON LA MICROBIOLOGIA E LA BATTERIOLOGIA INDUSTRIALE

A CURA DEI PROFESSORI

T. CASTELLI, PERUGIA - G. DE ROSSI, PERUGIA - V. PEGLION, BOLOGNA
B. PEYRONEL, TORINO - R. PEROTTI, PISA - I. POLITI, MILANO
P. RENCO, MILANO - S. RICCARDO, NAPOLI - M. SACCHETTI, BOLOGNA
O. VERONA, FIRENZE

DIRETTA DA
C. ARNAUDI, MILANO

Vol. IV - Fasc. III
1949

Segretario di Redazione
V. TRECCANI

DIREZIONE: VIA CELORIA, 2 - AMMINISTRAZIONE: VIA SALASCO, 4
MILANO

(ANN. MICR.)

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.

Ogni articolo deve essere corredato da un breve riassunto (non più di dieci linee) in italiano. Lo stesso deve essere pure riportato in tedesco o inglese o francese. 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 4 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 gli estratti dei lavori 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- condo = sec
ettogrammo = hg	decimetro = dm	millim. quadr = mmq	
grammo = g	centimetro = cm		
decigrammo = dg	millimetro = mm	litro = l	per cento = %
centigrammo = cg	micron = μ	centim. cubo = cc	per mille = ‰
milligrammo = mg		ora = h	normale = N
millesimo di grammo = γ	metro quadr = mq	minuto primo = min	decimo norm = 0, IN 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

	PAGINA
C. ARNAUDI- F. CARTASEGNA- M. PASSANI- Caratteri del latte trattato con acqua ossigenata elettrolitica a 130 vol. nei riguardi della caseificazione	41
R. TRECCANI BENETTI - A. SCHIESSER – Sovra le attività dei Flavobatteri, nei confronti dell'acido benzoico e di alcuni fenoli	69
VII° Congresso Nazionale di Microbiologia	75

Prezzo di Abbonamento per ogni volume (costituito di 6 fascicoli)

ITALIA L. 2000 - ESTERO L. 3000 - UN FASCICOLO SEPARATO L. 350

Caratteri del latte trattato con acqua ossigenata elettrolitica a 130 vol. nei riguardi della caseificazione

Carlo Arnaudi - Franco Cartasegna - Mario Passani

La possibilità di impiegare l'acqua ossigenata per il risanamento e la conservazione del latte è stata ravvisata da oltre quarant'anni. Fra il 1904 ed il 1910 numerose ricerche venivano dedicate all'argomento, e talune, come quelle di Troili-Peterson, erano espressamente rivolte a stabilire il grado di caseificabilità del latte trattato in tal guisa a dosi variabili. La maggior parte delle ricerche però, aveva intendimenti igienici perseguendo lo scopo di eliminare i microbi patogeni e di conservare il latte il più a lungo possibile.

L'argomento è stato ripreso e largamente studiato in Italia, sempre da un punto di vista igienico, dopo che l'industria chimica italiana ha preparato e posto in commercio l'acqua ossigenata pura elettrolitica a 130 Vol. (1). Così la letteratura dell'argomento si è andata rapidamente arricchendo di documenti sperimentali assai interessanti, che di recente sono stati passati in rassegna da Satta (2). Da essi risulta che il trattamento del latte con il 2 p. 1000 di acqua ossigenata può conseguire risultati pratici tali, da consigliarne l'impiego per migliorare le condizioni igieniche nell'approvvigionamento del latte ai centri abitati privi di impianti di pastorizzazione. Si noti che il problema del risanamento del latte riguarda non soltanto il latte alimentare ma anche quello destinato alla burrificazione ed alla preparazione di formaggi freschi e dolci, che non richiedono intensa salatura e lunga maturazione; infatti questi prodotti sono stati riconosciuti come possibili veicoli di microbi patogeni.

La conservazione del latte, specialmente durante la stagione calda, interessa poi tutto il latte industriale anche se destinato alla preparazione di formaggi a pasta cotta ed a lunga maturazione, poichè gran parte se non tutti i difetti e quindi i notevoli scarti di produzione, sono dovuti alla imponente microflora che si sviluppa nel latte dal momento della raccolta all'arrivo ai caseifici.

E' evidente quindi l'interesse che doveva destare anche nel campo lattiero-caseario la possibilità dell'impiego dell' H_2O_2 a 130 Vol. Giova rammentare

(1) E. Satta, L. Morandi, L. Satta, D. Moggi - *Il trattamento igienico del latte con acqua ossigenata elettrolitica pura 130 Vol.* (Medicina e Biologia Vol. III, 1943).

(2) E. Satta - *Significato e finalità del trattamento igienico del latte con acqua ossigenata elettrolitica a 130 Vol.* (Riv. It. di igiene 1948 NN. 5/6).

che i tecnici caseari italiani, come del resto quelli francesi e svizzeri, sono stati sempre restii alla adozione della pastorizzazione del latte destinato alla caseificazione, pratica che è invece assai diffusa nei Paesi del Nord Europa ed in America; nel timore di far perdere con ciò le proprietà caratteristiche dei formaggi tipici. Timore giustificato, in quanto il trattamento con il calore modifica più o meno intensamente il patrimonio enzimatico e vitaminico del latte, l'equilibrio colloidale e la proporzione fra le diverse specie microbiche presenti nel latte ed in particolare fra specie caseofile e specie anticasearie.

La gravità dei danni economici cui soggiacciono i produttori di formaggi a pasta cotta a lunga maturazione del tipo « grana » per causa della preponderanza della microflora anticasearia del latte è tale da far sì che essi ricorrono ad una sorta di espediente assicurativo, imponendo ai casari il versamento di una cauzione per garantirsi contro i danni delle fallanze che possono talvolta raggiungere e sorpassare il 50%, quando non coinvolgono intere partite. Poichè non è nelle possibilità del casaro di impedire che il latte giunga al caseificio con una microflora dannosa, ad evitare a sua volta i rischi, egli ricorre spesso a mezzi drastici onde impedire o limitare la possibilità che il formaggio subisca alterazioni per gonfiore. E' notorio che a tal fine viene impiegata largamente, seppur segretamente, la formalina. L'azione di questa si esercita su tutti i microbi del latte: anticaseari e caseofili, impoverendo così intensamente la microflora da rallentare ed alterare in modo grave il processo di maturazione, anche a causa delle modificazioni che i costituenti proteici del latte subiscono sicuramente sotto l'azione della formalina. Si evitano così danni per scarti, ma si avvilisce in modo preoccupante la qualità del formaggio e se ne prolunga il periodo di maturazione.

La possibilità di utilizzare l'acqua ossigenata a 130 Vol. ha destato notevole interesse, soprattutto per il fatto che questo antisettico è ad azione transitoria, verosimilmente non si lega con costituenti del latte e non vi permane, scomponendosi più o meno rapidamente in funzione della carica microbica e della temperatura.

Si è intraveduta così la possibilità di regolare la quantità dell'HP2 in relazione alla temperatura del latte e del tempo che intercorre fra trattamento e lavorazione, in guisa cioè da portare il latte in caldaia quando tutta l'acqua ossigenata è scomposta. Con la successiva aggiunta di culture pure selezionate di fermenti lattici o del siero-fermento, si garantisce la presenza di una buona flora microbica, indispensabile alla regolare e corretta maturazione.

Sulla base di queste considerazioni è stato ritenuto utile sottoporre il problema a ricerche sistematiche, atte a verificare le attitudini alla caseificazione del latte trattato con H_2O_2 .

* * *

L'impiego dell' H_2O_2 non soltanto come antisettico, bensì come sterilizzante del latte atto a conservargli il più possibile le sue caratteristiche fisiche, chimiche e fisiologiche, è stato tentato in passato onde ottenere latte sterile, non trattato con calore ed atto quindi allo studio delle attività enzimatiche

di particolari specie microbiche. Venti anni fa uno di noi (1) usò con esito favorevole H_2O_2 sotto forma di Perneozonio all'1% onde ottenere latte sterile che, dopo trattamento con catalasi, veniva cagliato con presame parimenti sterile. Tale procedimento non poteva avere che scopi sperimentali a carattere orientativo, date le notevoli quantità di H_2O_2 impiegate. I risultati ottenuti allora ci sono tuttavia assai utili in quanto dimostrano come il latte, anche trattato con elevate dosi di H_2O_2 , conservi la capacità di servire da substrato per i batteri lattici e quella di coagulare sotto l'azione del presame.

Anche le recenti ricerche di Bertarelli, Perogallo e Caserio (2), di Cimmino (3) e di Previtiera (4), dimostrano come il latte vaccino trattato con H_2O_2 elettrolitica pura a 130 Vol. non venga modificato nei suoi fondamentali caratteri chimico-fisici.

A) RICERCHE PRELIMINARI

Densimetria.

Alle ricerche espressamente dedicate al problema della caseificabilità, si fecero precedere prove orientative riguardanti le eventuali modificazioni della densità e viscosità del latte trattato con H_2O_2 nonchè la sua attitudine a servire come substrato nutritivo per i batteri lattici.

Tenuto conto dei risultati ottenuti dai precedenti sperimentatori per quanto riguarda i caratteri fisici, abbiamo rivolto la nostra attenzione particolarmente alle eventuali variazioni della viscosità e della densità del latte, in vista degli inconvenienti che sembravano sorgere nel controllo del latte trattato per svelare gli annacquamenti.

Sono state eseguite a tale scopo prove di densimetria su campioni di latte trattato con acqua ossigenata. Due prove sono state effettuate su latte intero ed una su latte scremato.

La prima prova su latte intero ha dato i seguenti risultati.

Lettura col lattodensimetro

a) Campione di latte di partenza	Densità 15°	1,0308
b) Lo stesso campione con aggiunta di H_2O_2 al 2 p. 1000 dopo 3 ore e ½, tenuto a temperatura di 25-30° C	» 15°	1,0312
c) Dopo 24 ore (25-30° C)	» 15°	1,0311

(1) C. Arnaudi - *Sulla cagliata sterile* (Rend. Ist. Lomb. Sc. e Lett. vol. LX 1927).

(2) E. Bertarelli, I. Perogallo, E. Caserio - *Il trattamento igienico del latte con H_2O_2 elettrolitica a 130 Vol.* (Ann. di Ig. 1944).

(3) G. Cimmino - *Sulla persistenza degli enzimi nel latte vaccino trattato con H_2O_2 elettrolitica a 130 Vol.* (Atti Acc. Fisiocritici di Siena 1944).

(4) A. Previtiera - *Il comportamento degli aminoacidi nel latte trattato con H_2O_2 elettrolitica a 130 Vol.* (Atti Acc. Fisiocritici di Siena 1946).

Lettura col picnometro

I picnometro

	Densità iniziale 15°	1,0309
(campioni resi molto ben omogenei)	» dopo 3 ore e ½	1,0311
	» » 24 »	1,0309

II picnometro

	Densità iniziale 15°	1,0292
(campioni non sufficientemente resi omogenei)	» dopo 3 ore e ½	1,0302
	» » 24 »	1,0312

La seconda prova ha dato i seguenti risultati:

Lettura col lattodensimetro

a) Campione di partenza	Densità 15°	1,0322
b) Lo stesso campione con H ₂ O ₂ dopo 24 ore a temperatura di 25-30° C.	» 15°	1,0321

Lettura col picnometro

I picnometro

	Densità iniziale 15°	1,0321
(campioni resi molto ben omogenei)	» dopo 24 ore	1,0322

II picnometro

(campioni non sufficientemente resi omogenei)	Densità iniziale 15°	1,0325
	» dopo 24 ore	1,0307

Risulta subito evidente che per una esatta determinazione della densità ha grande importanza il fatto che i vari campioni vengano resi omogenei, con una prolungata agitazione.

I dubbi sussistenti e le ipotesi circa una differenza di densità fra i campioni non trattati e trattati sono dovuti a due fattori:

1) durante le prime ore si ha uno sviluppo notevole di ossigeno; il gas si svolge liberamente, ma incontra lo strato superficiale di crema che in parte lo trattiene. Necessita quindi, volendosi procedere ad una determinazione della densità, di allontanare il più possibile queste inclusioni gassose che influiscono sensibilmente sui risultati;

2) lo sviluppo di O₂ dovrebbe facilitare l'affioramento della crema e quindi il controllo della butirrimitria degli strati superficiali di un campione non trattato e di uno trattato con acqua ossigenata dovrebbe confermare questa supposizione. Comunque, anche questo fattore determina la necessità di rendere molto omogeneo il campione di latte prima della determinazione.

I risultati sembrano confermare l'importanza di questa avvertenza. Infatti i risultati ottenuti con il lattodensimetro e con il primo picnometro, non hanno dato luogo a differenze sensibili in quanto si è cercato di rendere

il più possibile omogenei i campioni prima della determinazione. Con il secondo picnometro ciò non è stato fatto e le differenze ottenute sono state sensibili.

Nel latte scremato l'omogeneità dei campioni è molto più facile da ottenere e l'ossigeno eventualmente trattenuto dalla massa del latte, si libera subito dopo un paio di travasi.

I risultati ottenuti con un latte al 0,1 % di grasso sono stati i seguenti:

Con il lattodensimetro

campione di partenza	densità 15"	1,0329
dopo 6 ore con H ₂ O ₂	» 15°	1,0329

Con il picnometro

I picnometro	campione di partenza	densità 15°	1,0330
dopo 6 ore con H ₂ O ₂		» 15°	1,0330
II picnometro	campione di partenza	» 15°	1,0330
dopo 6 ore con H ₂ O ₂		» 15°	1,0331

Per vedere se nella proporzione del 2 p. 1000 l'acqua ossigenata può esplicare effettivamente una certa influenza sull'affioramento della crema, è stata effettuata la seguente prova:

da latte intero fresco, con un tenore di grasso del 3,7 %, sono stati prelevati 300 cc. e suddivisi in tre palloncini. A due di essi è stata aggiunta H₂O₂ in misura del 2 p. 1000. Il terzo conteneva il latte tal quale. Dopo 3 ore e ½ si è determinata la quantità di crema affiorata. Invece di prelevare i campioni dallo strato superficiale onde determinare direttamente la quantità di crema, si è preferito procedere ad un calcolo indiretto, determinando il tenore in grasso dello strato più basso. A tenori in grasso più bassi corrispondono tenori di crema superficiali più alti e viceversa.

I campioni sono stati prelevati con grande precauzione, in modo da escludere eventuali errori.

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- 1° palloncino con H₂O₂ 2 p. 1 000 tenore in grasso dello strato inferiore 1,7%
- 2° palloncino con H₂O₂ 2 p. 1 000 tenore in grasso dello strato inferiore 1,6%
- 3° palloncino senza alcuna aggiunta tenore in grasso dello strato inferiore 2%

I tre campioni, agitati e resi ben omogenei hanno dato tutte e tre un tenore in grasso del 3,7 % — eguale a quello del latte di partenza.

Questi risultati starebbero ad indicare una certa influenza dell'aggiunta di H₂O₂ e del relativo svolgimento di O₂ sull'affioramento della crema. Le cifre ottenute non vanno prese però in senso assoluto, ma soltanto come indice del fenomeno. Caserio, lavorando in condizioni di laboratorio, non ha riscontrato differenze sensibili riguardo alla densimetria in campioni trattati con acqua ossigenata ed in campioni non trattati, avendo ottenuto una perfetta omogeneità, m all'infuori dell'ambiente di laboratorio però, tutta la questione consiste nell'ottenere tale perfetta omogeneità. Questa precauzione,

già indispensabile per ottenere risultati esatti in qualsiasi determinazione densimetrica, riveste a maggior ragione importanza estrema nei campioni di latte trattati con H_2O_2 .

Ciò per due ragioni:

1) *la formazione di schiuma è abbondante* — si tratta di una emulsione di gas che qualora non venga rimossa può influire sensibilmente sui valori densimetrici (tra l'altro, se la densità viene misurata con un lattodensimetro normale, la lettura può riuscire difficile). Soltanto con una prolungata agitazione e successivi travasi è possibile eliminare queste inclusioni di gas e procedere quindi come per un latte normale. Questo appunto, che nelle prove di laboratorio come è ovvio viene tenuto presente, riveste la massima importanza nella comune pratica di latteria e nei controlli usuali che si compiono per la repressione delle frodi.

2) *Nelle prime ore lo svolgimento di O_2 facilita un affioramento più rapido della crema, aggravando quindi le condizioni per una esatta determinazione.*

Il Caserio sembra non condividere questa opinione, ma a tale proposito si ritiene opportuno rilevare che:

a) le determinazioni sulla velocità di affioramento della crema sono state da lui condotte con un cremometro di Chevalier, che non offre una sufficiente attendibilità nei risultati;

b) non viene specificato dopo quanto tempo è stata apprezzata la velocità di affioramento. Evidentemente, l'azione attivante dell' H_2O_2 è più sensibile nelle prime ore, mentre logicamente nelle ore successive i valori di affioramento tendono ad uguagliarsi.

Viscosità.

Si è proceduto a misurazioni della viscosità in campioni di latte normale trattato o non con H_2O_2 . A tale scopo si sono seguiti questi criteri:

1) è stato usato il viscosimetro di Ostwald e durante le determinazioni è stato possibile ottenere una sufficiente uniformità di temperatura.

2) Sono stati controllati:

a) il decorso dei valori di viscosità in campioni di latte come tale;

b) il decorso dei valori di viscosità in campioni di latte trattati con H_2O_2 al 2 p. 1000 secondo diverse modalità.

Sono stati effettuati anche controlli con H_2O distillata, in modo da poter ottenere i valori assoluti, oltre quelli relativi.

Vengono però riportati soltanto i valori di viscosità espressi in misure di tempo, poichè dato l'interesse comparativo delle esperienze, non è necessario introdurre dei valori assoluti.

Il comportamento di un campione di latte come tale rispetto alla viscosità è risultato il seguente:

Medicazione

Disinfezione

Deodorazione

AMUCHINA

(Reg. Min. Int. 100/42)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso umano

AMUCHINA "Z,"

(Reg. Min. Int. 100/43)

Medicamento disinfettante istofilo ad uso veterinario

ANTISAPRIL

(Reg. Min. Int. 99/41)

Disinfettante deodorante grezzo

LISICERINA

(Reg. Min. Int. 424)

Disinfettante antiaftoso

"C. L.,"

Per disinfezione e detersione delle bottiglie del latte

AMUCHINA Soc. p. Az.

Sede: GENOVA - Via B. Bosco, 37 - Telefono 55.357 - 53.723

Stabilimenti: SAMPIERDARENA - Via Pacinotti, 86 - Tel. 2.051

MILANO - Viale Umbria, 118 - Telefono 54-457

La razionale fabbricazione del formaggio esige che il caglio sia accuratamente controllato e con titolo costante.

A queste esigenze risponde

C. MOTTA & C. - MONZA

VIA CAIROLI 2a - TELEFONO 4613 - Casa Fond. nel 1926

Fabbrica monzese di caglio e coloranti per burro e formaggi



FABBRICA PRODOTTI CHIMICI

Dott. V. SACCO

MILANO

VIA FILIPPO BALDINUCCI, 91 - TEL. 97-254

Il "Neomoscan,, ideato presso l'Istituto Sperimentale di Lattaria in Kiel, è l'UNICO prodotto, che ha un potere DETERGENTE 3 volte superiore alla soda, unisce un'attività BATTERICIDA 5 volte maggiore dell'acido fenico, offre una perfetta COMPATIBILITÀ col latte e coi latticini, nonché una ASSOLUTA INNOCUITÀ su metalli, legno e gomma.

Il "Neomoscan,, brevettato in 19 paesi del mondo, ha dimostrato nella pratica industriale

- 1** di realizzare la pulizia e la disinfezione dei recipienti e delle macchine con un'ECONOMIA del 50%, sui vecchi sistemi, riducendo fortemente le spese di combustibile, mano d'opera, spazzole, ecc.
- 2** di contribuire in modo efficacissimo alla IGIENICITÀ del latte, al MIGLIORAMENTO dei prodotti caseari e alla buona MANUTENZIONE degli impianti.

la viscosità tende ad aumentare, sia pure molto lentamente. Probabilmente tale aumento è in rapporto con l'acidità che si va sviluppando.

Si riportano ora i risultati di una prova effettuata a questo riguardo:
Valore di viscosità all'inizio della prova tempo 1' 37" 1/10

»	»	»	dopo 2 h. e ½	1' 37"	6/10
»	»	»	dopo 7 h. e ½	1' 37"	5/10
»	»	»	dopo 24 h. e ½	1' 38"	2/10

Lo stesso campione di latte, pastorizzato a 63° C per 30' ha dato dei valori molto vicini a quelli ottenuti dopo 24 h. e ½ di permanenza.

Le prove effettuate su campioni di latte trattati con H₂O₂ al 2 p. 1000 hanno dato le seguenti indicazioni:

a) il campione di latte, addizionato di H₂O₂, non presenta logicamente delle differenze nei valori di viscosità al momento dell'aggiunta di H₂O₂;

b) la viscosità risulta progressivamente in aumento sensibile e costante e tale aumento si deve porre in relazione con lo svolgimento dell'ossigeno e col suo scioglimento nel mezzo, rappresentato dal latte.

I dati in proposito sono i seguenti:

- 1) un campione di latte addizionato di H₂O₂ al 2 p. 1000
ha fornito all'inizio della prova un valore di tempo 1' 39"
lo stesso campione, dopo 3 h. e ½ » 1' 47" 2/10
- 2) un campione di latte addizionato di H₂O₂ al 2 p. 1000
ha fornito all'inizio della prova un valore di » 1' 38" 8/10
lo stesso campione, dopo 3 h. e ½ » 1' 44" 8/10
- 3) un campione di latte addizionato di H₂O₂ al 2 p. 1000
ha fornito all'inizio della prova un valore di » 1' 41" 3/10
lo stesso campione, dopo 3 h. » 1' 45" 2/10
lo stesso campione, dopo 24 h. » 1' 49"
- 4) un campione di latte addizionato di H₂O₂ al 2 p. 1000
ha fornito all'inizio della prova il valore di » 1' 38" 3/10
lo stesso campione, dopo 24 h; » 1' 45" 8/10

L'aumento della viscosità che si riscontra nei campioni di latte trattato con H₂O₂ è in diretto rapporto con lo svolgimento e soprattutto con lo scioglimento dell'ossigeno nel latte stesso.

Infatti:

- a) un campione di latte addizionato di H₂O₂
ha dato all'inizio della prova un valore di tempo 1' 38" 2/10
- b) lo stesso campione, addizionato subito dopo di catalasi di fegato in modo da ottenere lo svolgimento

- dell'ossigeno ma non rendendo possibile il suo scioglimento nel latte dato il decorso rapido della reazione (1), ha dato un valore poco dissimile » l' 38" 1/10
- c) dopo 24 h. il campione di latte trattato con H₂O₂ al 2 p. 1000 lasciato a sè, dava invece il valore di » l' 45" 8/10

Una seconda prova effettuata con la stessa modalità, ha dato risultati eguali. In definitiva, l'aumento di viscosità va collegato con la presenza nel mezzo, di ossigeno disciolto.

Comportamento del latte trattato con H₂O₂ come substrato nutritivo per i fermenti lattici.

Il trattamento del latte vaccino con H₂O₂ (130 Vol.) a dosi variabili fra l'1 ed il 3 per mille, non induce alterazioni che impediscano il normale sviluppo dei comuni fermenti lattici. E' necessario però che sia trascorso un tempo sufficiente a che l'H₂O₂ risulti scomposta, oppure che la scomposizione stessa venga accelerata mediante l'aggiunta di catalasi.

Evidentemente la velocità di scomposizione è in rapporto con la quantità di comuni microrganismi inquinanti (che sono per la massima parte energetici elaboratori di catalasi) e con la temperatura cui il latte viene sottoposto durante la conservazione.

Dalle numerose esperienze condotte in proposito, riportiamo la seguente che illustra l'andamento del fenomeno.

Vengono impiegati due campioni di latte:

a) latte della stalla dell'Istituto di Zootecnica dell'Università di Milano, raccolto igienicamente in recipienti sterili ed immediatamente sottoposto a trattamento con H₂O₂. Carica batterica iniziale = 36.000 microbi per cc

b) latte proveniente dalla Centrale del latte di Milano destinato alla pastorizzazione. Carica batterica iniziale = 2.300.000 microbi per cc.

I due campioni vengono trattati con il 2 e 3 per mille di H₂O₂ 130 Vol., suddivisi in piccole porzioni e posti in termostato a 40° C. Dopo tempi diversi sono in parte esauriti con catalasi di fegato sterile ed in parte lasciati tali. Tutti vengono quindi insemenzati con *Streptococcus lacticus*, *Streptococcus thermophilus* e *Thermobacterium helveticum* e posti alle rispettive temperature ottime di incubazione.

(1) Per rendersi conto del diverso decorso riguardante lo svolgimento dell'ossigeno nel latte trattato con H₂O₂, è stata effettuata la seguente prova: in due palloncini sono stati posti 150 cc. di latte normale e trattato con H₂O₂ al 2 p. 1000. Ad uno è stata aggiunta immediatamente della catalasi, in modo da ottenere lo svolgimento rapido di tutto l'ossigeno. Nel secondo tale aggiunta non è stata effettuata.

Dopo circa un'ora, dal primo palloncino si erano svolti allo stato gassoso circa 35 cc. di ossigeno, mentre dopo 5 h. e ½ dal secondo palloncino risultava svolta una quantità di 27 cc. soltanto. Tali valori restavano inalterati ancora dopo 36 ore.

I risultati ottenuti sono raccolti nella tabella seguente:

A) *Serie trattata con il 2 per mille di H₂O₂ 130 Vol.*

Latte igienico

1) Senza trattamento con catalasi

Semina dei batteri lattici dopo:

ore 24	nessuna coagulazione
» 48	» »
» 72	» »
» 96	coagulazione soltanto nelle provette seminate con <i>Streptococcus lacticus</i> .

L'osservazione è fatta dopo 48 ore dalla semina e permanenza in termostato.

2) Trattamento con catalasi dopo 24 ore di termostato a 40° C e contemporanea semina dei batteri lattici.

Dopo 24 ore di incubazione alle rispettive temperature ottime, si nota coagulazione più o meno intensa e compatta per tutti gli stipti seminati; il coagulo risulta stracciato e filamentoso.

Latte normale

1) Senza trattamento con catalasi

Semina dei batteri lattici dopo:

ore 24	coagulazione nelle provette seminate con <i>Str. lact.</i>
» 48	coagulazione nelle provette seminate con i tre batteri
» 72	coagulazione nelle provette seminate con i tre batteri
» 96	coagulazione nelle provette seminate con i tre batteri

2) Trattamento con catalasi

I risultati ripetono quelli ottenuti con latte igienico.

B) *Serie trattata con il 3 per mille di H₂O₂ 130 Vol.*

I risultati sono assolutamente analoghi a quelli precedenti.

Il comportamento del latte igienicamente raccolto non è soltanto da mettere in relazione con la modesta carica microbica, ma anche con la natura della particolare microflora, costituita come è noto per la gran parte da streptococchi lattici che non soltanto non elaborano catalasi, ma sono essi stessi modesti produttori di H₂O₂ (1).

Il grado dell'attitudine del latte trattato con H₂O₂ a consentire lo sviluppo di microbi e di batteri lattici in particolare, è connesso quindi con il complesso dei fattori che regola l'esaurimento dell' H₂O₂ aggiunta e cioè la microflora capace di elaborare catalasi, il tempo di azione e la temperatura di conservazione. Fra i 25 ed i 40° C la velocità di scomposizione è particolarmente rapida.

(1) J. W. Mc Leod - *A system of Bacteriology* (Med. research Council - Londra, 1930).

Si deve osservare però che il comportamento del latte trattato, come substrato per i batteri lattici, non deve essere valutato solamente in base alla rapidità di formazione del coagulo ed alla compattezza, come è uso nella comune pratica di batteriologia casearia.

La valutazione stessa deve essere corredata dall'esame culturale od almeno da quello microscopico. Infatti, il latte trattato con H_2O_2 sia che questa venga esaurita con l'aggiunta di catalasi, sia che venga lasciato a sè fino alla scomposizione di tutta l' H_2O_2 , quando viene successivamente seminato con batteri lattici presenta caratteri di coagulabilità che si distaccano dalla norma. Quanto maggiori sono le quantità di batteri insemnati, tanto più spiccati appaiono i caratteri di anormalità che risultano inoltre più appariscenti per i termobatteri che per gli streptococchi. Se si procede al conteggio dei batteri sviluppati mediante l'allestimento di piastre con agar siero-peptone oppure alla valutazione microscopica, si può constatare che la moltiplicazione è regolare ed i successivi trapianti in latte tindalizzato od in latte igienico pastorizzato danno luogo a coaguli normali.

Le nostre ricerche, compiute in vista di indagare l'eventuale influenza dell' H_2O_2 sulle vitamine del latte e sullo stato del calcio e fosforo nei complessi colloidali del latte, hanno confermato quanto avevano già segnalato Satta, Morandi e Moggi (1) e cioè che nessuna sensibile variazione può essere osservata in seguito al trattamento con H_2O_2 130 Vol. alle dosi del 2 e 3 per mille. Il problema deve essere quindi ancora chiarito ma la sua importanza pratica non appare di grande rilievo, visto che sotto l'azione del presame il latte ossigenato dà luogo a coagulazione regolare, benchè ne richieda una quantità maggiore.

Già dalle esperienze di Arnaudi del 1927 (2) risultava che il latte trattato con dosi ben più elevate di H_2O_2 subiva ancora il processo di coagulazione e di sineresi. Ai fini applicativi su scala industriale si rendeva però necessario di sottoporre a studio più attento i caratteri tecnologici del coagulo ed a tal fine vennero intraprese le esperienze descritte in appresso.

(1) E. Satta, L. Morandi, R. Satta, D. Moggi - *Il trattamento igienico del latte con acqua ossigenata elettrolitica pura a 130 Vol.* (Medicina e Biologia Vol. III, 1943).

(2) C. Arnaudi (l.c.).

B) - Influenza dell'acqua ossigenata sui caratteri fisici del coagulo presamico

Con le ricerche di cui segue l'esposizione si è voluto seguire il comportamento del coagulo presamico, considerato nei suoi caratteri fisici, in latte trattato in varie condizioni con acqua ossigenata elettrolitica 130 Vol. nei confronti di campioni di controllo in bianco. Ad espressione sintetica dei suddetti caratteri fisici si è assunto il valore della resistenza che il coagulo offre alla rottura.

La dose di acqua ossigenata impiegata è stata quella del 2 per mille, rivelatasi in numerose esperienze la più razionale e nello stesso tempo efficace agli effetti della conservazione del latte. In alcune esperienze si sono impiegate dosi minori, indicate di volta in volta.

Il latte occorrente venne prelevato, per ragioni contingenti, parte direttamente alla stalla e parte dalla Centrale del Latte di Milano: sempre si è fatto uso di latte crudo intero.

Per la determinazione della resistenza alla rottura del coagulo, effettuata secondo i casi o immediatamente dopo il trattamento con acqua ossigenata o dopo una permanenza del latte trattato di 18-24 ore in termostato a 40° oppure a 30°, ci si è serviti del dispositivo dinamometrico derivato dall'analogo di Hill (1).

Il latte, trattato nei modi che saranno indicati, venne introdotto nella quantità di 250 cc. in bicchiere a forma alta, della capacità di 600 cc. Mantenuto in bagnomaria sino al raggiungimento della temperatura di 37°, si aggiunse una dose determinata di caglio liquido 1/10.000, si agitò e si applicò uno dei coltelli di cui è corredato l'apparecchio; si mise a coagulare in termostato a 37° e dopo 40 minuti si effettuò la misurazione della resistenza del coagulo, operando con movimento lento e continuo.

Sempre si è proceduto alla determinazione del pH sul latte in partenza e all'atto dell'aggiunta del presame.

A questo proposito è bene porre in rilievo che le determinazioni di pH relative al latte trattato con acqua ossigenata sono state eseguite a mezzo di indicatori (bromocresolporpora, bromotimolbleu, clorofenolrosso, cartine Liphon) oppure con la tecnica potenziometrica, avendo però in tal caso l'avvertenza di scomporre prima l'acqua ossigenata con catalasi di fegato. Seguendo infatti al potenziometro le variazioni del pH rispetto a quello iniziale in campioni di latte ossigenato, si può riscontrare che il pH di un latte fresco, generalmente intorno a 6,6- 6,7 (corrispondente a 6-7 gradi Soxlet-Henkel) discende bruscamente di circa due unità rispetto al controllo, risalendo poi con lentezza man mano che procede la scomposizione catalitica dell'acqua ossigenata sino a raggiungere il valore di partenza a scomposizione ultimata.

Alcuni autori hanno posto tale variazione accusata dal pH subito dopo l'aggiunta dell'acqua ossigenata in relazione con l'acidità totale del prodotto

(1) Annali di Microbiologia Vol. II Fasc. III.

che è di gr. 0,09 per litro espressa in acido solforico. L'acidità libera che in tal caso è quella che interessa, dice ad es. il Satta (1), è rappresentata in gran parte da acido fosforico il quale nel latte viene pertanto progressivamente neutralizzato. Questa affermazione è però in contrasto con la normalità dei risultati che si ottiene effettuando previamente la scomposizione dell'acqua ossigenata con catalasi oppure usando metodi colorimetrici.

Sembra quindi più attinente alla realtà l'ipotesi che la brusca diminuzione di pH e la successiva corsa ascendente non rappresentino dei dati effettivi ma derivino esclusivamente da uno squilibrio funzionale agli elettrodi dovuto al fatto che l'ossigeno originantesi dalla scissione dell'acqua ossigenata, (fenomeno che si inizia subito al contatto con il latte) producendo una ossidazione dell'idrochinone, induce un'alterazione nel sistema ossidoriduttivo. Con la graduale diminuzione dell'intensità di svolgimento dell'ossigeno il pH si riporterebbe quindi verso la normalità fino a raggiungere il valore iniziale.

Per quanto riguarda le semine di batteri lattici effettuate nel corso delle presenti esperienze si è fatto uso di ceppi di *Streptococcus lactis* e di *Lactobacillus bulgaricus* impiegati in percentuali diverse e separatamente oppure congiuntamente in pari proporzioni.

Prima di passare ad illustrare i risultati ottenuti si ritiene opportuno ricordare che la resistenza del coagulo presamico è influenzata da alcune condizioni fisico-chimiche, essenzialmente temperatura, grado di acidità e aggiunta di sali di calcio, fra quelle attualmente note.

Da prove eseguite in merito dal Politi (2) appare infatti chiaramente come la resistenza del coagulo aumenti con l'elevarsi della temperatura alla quale viene mantenuto il latte durante il tempo di coagulazione, fino al limite che costituisce l'optimum d'azione per il caglio, e analogamente si comporti nei riguardi di gradi crescenti di acidità e di progressive aggiunte di cloruro di calcio, fino ai limiti che potrebbe essere interessante stabilire.

Orbene, nel latte trattato con il 2 % di acqua ossigenata si verifica lo stesso fenomeno ma i valori assoluti delle resistenze dei coaguli sono inferiori rispetto a quelli ottenuti nelle identiche condizioni del latte di controllo.

Ciò appare evidente nei riguardi del grado di acidità e dell'aggiunta di cloruro di calcio osservando i risultati delle varie serie di prove raccolti nelle relative tabelle, e il medesimo andamento è logico supporre anche nei confronti della temperatura.

Il primo gruppo di prove ebbe pertanto la funzione di vedere se, esaurendo con catalasi di fegato l'azione dell'acqua ossigenata dopo 18-22 ore dal trattamento, il latte ritornasse normale nei riguardi della resistenza del coagulo.

Nell'eventualità che ciò non si verificasse e mirando ad ottenere ugualmente valori di resistenza uguali a quelli dei controlli, si seminarono contemporaneamente alcuni campioni, esauriti o no, con quantità crescenti di fermenti lattici allo scopo di raggiungere il risultato desiderato attraverso un

(1) E. Satta - (l.c.).

(2) I. Politi - *Ricerche sui fermenti lattici* (Nota III - Annali di Microbiologia - Fasc. I - Vol. II - 1941).

abbassamento del pH. Come si può agevolmente constatare dai risultati di cui alle Tabelle n. 1 - 2 - 3 e 4, con l'uso della catalasi le condizioni del latte permangono anormali e la cosa può trovare spiegazione nel fatto che dopo 18-22 ore dal trattamento la scissione dell'acqua ossigenata è molto avanzata. Non si ha quindi altra azione che quella di scomporre con svolgimento di ossigeno le ultime frazioni ancora esistenti nel latte.

Il vantaggio che se ne ricava si dimostra del tutto nullo in riferimento ai campioni non seminati dopo l'asaurimento dell'acqua ossigenata e solamente proficuo in caso di una abbondante semina di fermenti lattici in quanto, allontanandosi ossigeno, il substrato rimane meno sfavorevole per la vita dei microorganismi, e questi ultimi, presenti in numero elevato, possono dar luogo ad un maggiore grado di acidità.

Per ottenere risultati positivi è necessaria in ogni caso la permanenza in termostato (a 37° oppure a 30° secondo la specie usata), per un certo numero di ore, dei campioni seminati.

Prove effettuate seminando i batteri lattici all'atto dell'aggiunta del caglio non hanno infatti portato a constatare che differenze della minima entità e largamente comprese nei limiti di approssimazione del metodo fra le porzioni esaurite con catalasi e quelle non esaurite (vedi Tabella n. 5).

Si può affermare che al conseguimento di valori di resistenza pari a quelli dei controlli, logicamente non seminati, è possibile pervenire solamente abbassando il pH all'incirca di 0,3 unità al disotto di quello dei suddetti, il che si ottiene insemenzando con un minimo del 2 % di innesto, dopo esaurimento con catalasi.

TABELLA N. 1
pH iniziale del latte: 6,75
Dose di caglio usata: cc. 0,1

<i>Controllo</i>	pH	Resistenza al dinamometro
22 h. in cella frigorif. poi 3 h. ½ in termostato a 37° <i>Latte + H₂O₂</i>	6.60	71
(22 h. in termost. a 40° poi 3 h. ½ in termostato a 37° <i>Idem esaurito con catalasi</i>	6.75 6.72	36 39
<i>Latte + H₂O₂ + germi (0,25%)</i>	6.68	42
<i>Idem esaurito con catalasi</i>	6.65	43

TABELLA N. 2
pH iniziale del latte: 6,58 — Dose di caglio usata: cc. 0,1

<i>Controllo</i>	pH	Resistenza al dinamometro
(determinazione della resistenza effettuata subito dopo il prelievo del latte) <i>Latte + H₂O₂</i>	6.58	72
(23 h. in termost. a 40°, poi 3 h. in termostato a 37°) <i>Idem esaurito con catalasi</i>	6.58 6.56	36 39

TABELLA N. 3
 pH iniziale del latte: 6,60 — Dose di caglio usata: cc. 0,5

	pH	Resistenza al dinamometro
<i>Latte controllo (A)</i> (determinaz. resist. effett. dopo 6 h. dal prelievo; in detto periodo il latte è rimasto all'ambiente)	6.48	92
<i>Latte controllo (B)</i> (idem c.s.)	6.48	88
<i>Latte + H₂O₂</i> (a 6 h. dal prelievo si è effet. il trattam. con H ₂ O ₂ e immediat. dopo la determinaz. della resist.)	6.48	60
<i>Latte + H₂O₂</i> (determinaz. effett. dopo 20 h. di perman. in termost. a 40°)	6.48	56
<i>Latte + H₂O₂ + fermenti (1%)</i> (20 h. in termost. a 40°)		
(4 h. in termost. a 37° dopo la semina)	6.43	63
<i>Idem - 6 h. in termost. 37° dopo la semina</i>	6.38	70
<i>Latte + H₂O₂ 6 h. termost. 37° senza sem.</i>	6.48	55

TABELLA N. 4
 pH iniziale del latte: 6,65 — Dose di caglio usata: cc. 0,5

	pH	Resistenza al dinamometro
<i>Controllo</i> (determinaz. resist. effett. subito dopo il prelievo del latte)	6,65	68
<i>Latte + H₂O₂</i> (determinaz. effett. subito dopo il prelievo e conseguente trattam.)	6,65	49
<i>Latte + H₂O₂</i> (23 h. in termost. a 40°, poi 4 h. in termostato a 37°)	6,65	50
<i>Idem - 6 h. in termost. 37° dopo la semina</i>	6,65	49
<i>Controllo</i> (4 h. in termost. a 37° dopo il prel.)	6,58	71
<i>Latte + H₂O₂ + fermenti (2 %)</i> (23 h. in termost. a 40°, 4 h. in termost. a 37° dopo la semina)	6,58	55
<i>Idem esaurito con catalasi</i>	6,31	69
<i>Idem esaurito con catalasi</i> 6 h. in termost. 37° dopo la sem.	6,24	73

TABELLA N. 5

pH iniziale latte: 6,68 — Dose caglio usata: 1 cc. diluiz. 1/10

<i>Latte + H₂O₂</i> (A)	Resistenza al dinamometro
(seminato con l'1% all'atto dell'aggiunta del caglio)	57
<i>Idem c.s.</i> (B)	56
<i>Idem esaurito con catalasi</i> (A)	58
<i>Idem c.s.</i> (B)	59

Stabilito ad ogni modo che, a pari grado di acidità, la resistenza dei coaguli in latte trattato con acqua ossigenata è un po' inferiore rispetto a quella dei controlli non trattati, si fece l'ipotesi che l'azione dell'ossigeno portasse ad uno squilibrio nel rapporto caseina-sali di calcio e si volle pertanto sperimentare l'effetto di una aggiunta di cloruro di calcio in ragione dello 0,052%.

Si potè però riscontrare (vedi Tabella N. 6) che, addizionando detto composto dopo le 18-24 ore dal trattamento con H₂O₂ su latte esaurito o meno con catalasi e tenuto per 4 h. in termostato a 37° dopo aver seminato con il 2 % di fermenti lattici, se minore diveniva l'abbassamento di pH necessario per ottenere risultati di resistenza dell'ordine di quelli dei controlli non seminati (e ciò evidentemente in virtù della già dimostrata azione favorevole del CaCl₂ sulla resistenza del coagulo), pur tuttavia persistevano nel latte le condizioni di anormalità.

Nei controlli seminati anche con dosi inferiori a quella sopracitata, il pH raggiungeva limiti più bassi portando di conseguenza a maggiori resistenze dei coaguli.

Rimaneva quindi ignoto il meccanismo dell'azione esercitata dall'ossigeno mentre si era chiarito il fatto che anche a distanza di 18-24 ore dal trattamento con acqua ossigenata, pur esaurendo con catalasi e addizionando cloruro di calcio, il substrato manteneva caratteristiche tali da renderlo meno favorevole alla crescita dei microrganismi ed al conseguente processo di acidificazione.

TABELLA N. 6

pH iniziale del latte: 6,64 - Dose di coagulo usata: cc. 0,1

<i>Controllo</i>	pH	Resistenza al dinamometro
(determinaz. resist. effett. subito dopo il prel. del latte)	6,64	49
<i>Latte + H₂O₂</i> (determinaz. effett. subito dopo il prel. del latte e conseguente immediato trattam.)	6,64	36
<i>Controllo + fermenti (1%)</i> (4 h. in termost. a 37° dopo la semina)	6,27	75
<i>Controllo + fermenti (2%)</i> (idem c.s.)	6,12	84

<i>Controllo + fermenti (2%) + CaCl₂</i>		
(idem c.s.)	6,10	93
<i>Latte + H₂O₂ + fermenti (2 %)</i>		
(23 h. in termost. a 40°, 4 h. in termost. a 37° dopo la semina)	6,52	38
<i>Idem c. s. + CaCl₂</i>	6,52	45
<i>Idem c. s. + CaCl₂ esaurito con catalasi</i>	6,37	55

In sostanza, in base alle esperienze fin qui svolte, gli inconvenienti nel latte trattato con acqua ossigenata si potevano considerare di duplice natura: uno inerente la minor possibilità di sviluppo dei fermenti lattici e l'altro derivante da una ignota azione sui costituenti del latte. Che poi i due fenomeni fossero collegati fra loro oppure indipendenti, non si è in grado di stabilire.

Ad ogni modo la possibilità di raggiungere mediante quantità crescenti di semina con fermenti lattici, previo esaurimento con catalasi ed eventuale aggiunta di CaCl₂, pH tali da consentire l'ottenimento di risultati pari a quelli dei controlli, aveva per ovvie ragioni dal lato pratico un'importanza del tutto relativa, specialmente considerandola nei confronti di controlli seminati.

Si rendeva pertanto necessario lo studio e la ricerca delle cause originanti l'anormale comportamento del latte trattato rispetto alla resistenza del coagulo anche a pari grado di acidità, per vedere di giungere, attraverso la conoscenza delle stesse, ad eliminarne, con una opportuna tecnica, gli effetti negativi.

A questo punto, prima di iniziare la ricerca, si fece la supposizione che la minor resistenza del coagulo in latte trattato potesse non dipendere direttamente da turbamenti avvenuti nella costituzione chimico-fisica del latte bensì dal fatto che la presenza dell'ossigeno portasse ad un fenomeno di ritardo dell'azione del caglio. In tal caso, occorrendo un intervallo di tempo maggiore per la coagulazione e diminuendo di conseguenza il tempo di contatto del caglio con il latte coagulato, ne sarebbero derivati risultati di resistenza inferiori, data la minor compattezza del coagulo.

E' opportuno far rilevare al proposito che le determinazioni di resistenza alla rottura sono state sempre effettuate dopo 40 minuti dall'aggiunta del caglio anche se la quantità dello stesso era atta a coagulare in un tempo inferiore, e non immediatamente dopo la coagulazione.

Un'azione ritardatrice sul caglio in latte trattato con H₂O₂ già era stata rilevata dal Caserio (3) seguendo i tempi di coagulazione.

Il predetto autore afferma infatti che, subito dopo il trattamento con H₂O₂ al 2 %, il tempo impiegato per la coagulazione è nettamente superiore; dopo 12 h. dal trattamento è ancora elevato mentre dopo 20 h. i tempi risultano solo lievemente superiori a quelli richiesti dal latte non trattato.

(3) E. Caserio - *Il trattamento igienico del latte con acqua ossigenata elettrolitica pura* a 130 Vol. (Ann. di Ig. 1944).

Egli attribuisce l'azione ritardatrice ad un fenomeno di inibizione esercitato dall' H_2O_2 sulla carica enzimatica, asserendo che, anche usando dosi di presame più elevate, la velocità di coagulazione non resta influenzata, come si verifica nel latte tal quale e in quello addizionato di H_2O_2 dopo che questa ha subito la scissione catalitica.

I risultati raccolti nella Tabella N. 7 portano ad affermare:

1) Ammettendo che ad una minor velocità di coagulazione faccia riscontro una minor resistenza del coagulo presamico, i più bassi valori che si verificano in latte trattato con acqua ossigenata rispetto ai controlli addizionati della medesima quantità di caglio, sarebbero una conferma della citata azione ritardatrice.

Ponendo in relazione i dati ottenuti dal Caserio sui tempi di coagulazione con quelli ricavati dalle presenti esperienze sulle resistenze dei coaguli, non dovrebbero sussistere dubbi in proposito.

Ad ogni buon conto si potrà avere la certezza assoluta in via diretta seguendo contemporaneamente il tempo di coagulazione e la resistenza del coagulo dopo 40 minuti dall'aggiunta del caglio oppure indirettamente effettuando la coagulazione, in latte trattato e non trattato, con acidi organici anzichè con presame.

Due determinazioni in quest'ultimo senso sono state eseguite ma non coincidendo perfettamente i risultati (vedi tabella n. 8), per quanto le differenze riscontrate in una di esse possano rientrare nei limiti di approssimazione del metodo, non si può attribuir loro un valore definitivo.

2) I valori ottenuti usando dosi crescenti di caglio conducono a costatazioni in parte discordanti da quelle del Caserio poichè anche nel latte appena trattato con H_2O_2 , come in quello tal quale ed in quello trattato ed esaurito con catalasi dopo 18-24 h., una maggior quantità di presame dà luogo ad una più alta resistenza del coagulo ed è giustificato supporre, quindi, anche ad una più veloce coagulazione.

3) Confrontando i valori ottenuti agendo sulla quantità di caglio con quelli raggiunti tenendone invece fissa la dose e variando la percentuale di semina, si può facilmente rilevare che, con l'impiego di una quantità doppia di presame e senza semina di fermenti lattici si possono ottenere, in riferimento ai controlli, risultati pari o superiori a quelli conseguibili nel secondo caso con semine dell'ordine del 3-4 % (vedi tabella n. 9).

TABELLA N. 7 (a)

pH iniziale del latte: 6,64 — Dosi di caglio usate: cc. 0,1- cc. 0,2

<i>Controllo</i>	pH	Resistenza al dinamometro
(determinaz. resist. effett. subito dopo il prelievo)	6,64	49
<i>Latte + H₂O₂ (caglio cc. 0,1)</i>		
(determinaz. effett. subito dopo il preliev. e immediato trattam.)	6,64	36
<i>Idem c.s. (caglio cc. 0,2)</i>	6,64	50

TABELLA N. 7 (b)

pH iniziale del latte: 6,65 - Dosi caglio usate: cc. 0,5-1-2 – dil. 1/10

	pH	Resistenza al dinamometro
<i>Controllo (cc. 0,5 caglio)</i> (determinaz. resist. effett. subito dopo il prelievo del latte)	6,65	35
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 0,5 caglio)</i> (determinaz. resist. effett. subito dopo il prelievo e conseg. immed. trattam.)	6,65	31
<i>Idem c.s. (cc. 1 caglio)</i>	6,65	53
<i>Idem c. s. (cc. 2 caglio)</i>	6,65	62
<i>Controllo (cc. 0,5 caglio)</i> (determinaz. resist. effett. dopo 5 h. dal prelievo del latte; in detto periodo il latte è rimasto all'ambiente)	6,45	48
<i>Controllo (cc. 1 caglio)</i> (idem c. s.)	6,45	63
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 0,5 caglio)</i> (idem c. s. trattam. dopo le 5 h.)	6,45	38
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 1 di caglio)</i> (idem c. s. trattam. dopo le 5 h.)	6,45	56
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 2 di caglio)</i>	6,45	63
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 0,5 caglio)</i> (22 h. in termost. a 40°)	6,65	26
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 1 di caglio)</i> (idem c. s.)	6,65	34
<i>Latte + H₂O₂ (cc. 2 di caglio)</i>	6,65	44

TABELLA N. 8

	Resistenza al dinamometro
<i>Controllo</i> (coagul. con acido lattice all'8‰ in H ₂ O).	64
<i>Latte + H₂O₂</i> (idem c.s.)	64
<i>Controllo</i> (coagul. con acido lattice al 10‰ in H ₂ O).	82
<i>Latte + H₂O₂</i> (idem c.s.)	75

TABELLA N. 9

pH iniziale del latte: 6,68 - Dose caglio usata: cc. 0,5 diluiz. 1/10

Controllo	pH	Resistenza al dinamometro
(4 h. in termost. a 37° dopo il prelievo del latte)	6,60	42
<i>Idem seminato con 0,5% di fermenti lattici</i>	6,35	60
<i>Idem seminato con l'1% di fermenti lattici</i>	6,25	68
<i>Idem seminato con il 2% di fermenti lattici</i>	6,10	78
<i>Latte + H₂O₂ (semina 0,5%)</i> (22 h. in termost. a 40°, poi 4 h. in termost. a 37° dopo la semina)	6,55	29
<i>Latte + H₂O₂ (semina 1%)</i> (idem c.s.)	6,40	34
<i>Latte + H₂O₂ (semina 2%)</i>	6,35	37
<i>Latte + H₂O₂ (semina 3%)</i>	6,30	42
<i>Latte + H₂O₂ (semina 4%)</i>	6,27	42

Circa il meccanismo dell'azione ritardatrice sul caglio che si verifica in latte trattato, si potrebbe formulare l'ipotesi che esso sia legato ad una reazione di natura chimica.

Le attuali nozioni sulla costituzione del caglio portano a credere che si tratti di una vera sostanza albuminoide nella quale esistono parecchi gruppi ammidici uniti con debole e diversa affinità, gruppi che danno al presame un carattere di instabilità. Subendo una ossidazione detti gruppi labili potrebbero staccarsi sotto forma di ammoniaca e ne conseguirebbe un minor potere d'azione.

L'acidità avrebbe invece la funzione di proteggere, se pur non completamente, detti gruppi ammidici, aumentandone la stabilità ed accrescendo quindi la forza coagulante.

Siamo nel campo delle ipotesi e soltanto proseguendo le ricerche si potrà addivenire a risultati concreti.

Anche su alcune prove in corso dirette ad esaminare la possibilità di neutralizzare l'azione dell'ossigeno sul caglio mediante l'impiego di sostanze riducenti appare prematuro ogni apprezzamento: è sufficiente qui averne fatto cenno.

Resta comunque il fatto che l'azione ritardatrice è rilevabile anche a distanza di 20-24 h. dal trattamento, quando cioè la scomposizione catalitica dell'acqua ossigenata è quasi al termine ed anche dopo l'esaurimento con catalasi.

Accertato pertanto che una doppia quantità di caglio poteva portare ad una normalità nei risultati di resistenza del coagulo, si è voluto ripetere la prova in condizioni non molto discoste da quelle esistenti in pratica per la preparazione razionale dei formaggi.

La tecnica seguita è stata la seguente:

- 1) trattamento con acqua ossigenata al 2 ‰
- 2) permanenza per 18 h. in termostato a 30° del latte trattato
- 3) semina dei fermenti lattici in dose dell'1% e aggiunta immediata del caglio
- 4) coagulazione (40 minuti)
- 5) determinazione della resistenza del coagulo dopo 40 minuti.

I relativi risultati ottenuti sono raccolti nelle tabelle 10 - 11 e 12. Dal loro esame si può riscontrare come una dose doppia di caglio non è generalmente più in grado di ristabilire l'uguaglianza fra i valori delle resistenze e ciò probabilmente in virtù del maggior abbassamento di pH che si produce nel latte di controllo rispetto a quello trattato con H₂O₂ durante i 40 minuti di permanenza in termostato a 37°. Occorrerà perciò usare una quantità all'incirca tripla, per quanto i risultati ottenuti con dose doppia siano già molto vicini a quelli dei controlli ed in pratica forse più che sufficienti.

Ciò naturalmente vale in riferimento a semine dell'1%, in quanto semine maggiori porterebbero a maggiori divari di pH e di conseguenza alla necessità di aggiunte superiori di caglio senza peraltro avere la garanzia di risultati positivi in quanto, se è vero che il tempo impiegato dal latte per coagulare è in ragione inversa della quantità di caglio, la legge si verifica però entro certi limiti, oltre i quali anche l'aggiunta di una quantità rilevante non riesce ad eccelerare la coagulazione.

TABELLA N. 10

pH iniziale del latte: 6,65 - Caglio tit. 1/10000 usato in dil. 1/10

<i>Controllo (A) senza semina</i>	Resistenza al dinamometro
(cc. 0,5 di caglio)	43
<i>Controllo (B) senza semina</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	48
<i>Controllo (A) con semina 1%</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	64
<i>Controllo (B) con semina 1%</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	66
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (A)</i>	
(cc. 1 di caglio)	54
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (B)</i>	
(cc. 1 di caglio)	56
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (A)</i>	
(cc. 1,5 di caglio)	65
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (B)</i>	
(cc. 1,5 di caglio)	71

La determinazione dei controlli venne effettuata subito dopo il prelievo del latte.

TABELLA N. 11

pH iniziale del latte: 6,65 - Caglio tit. 1/10000 usato in dil. 1/10

	Resistenza al dinamometro
<i>Controllo (A) senza semina</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	40
<i>Controllo (B) senza semina</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	43
<i>Controllo (A) con semina 1% (A)</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	65
<i>Controllo (B) con semina 1% (B)</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	66
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (A)</i>	
(cc. 1 di caglio)	57
<i>Idem esaurito con catalasi</i>	59
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1% (B)</i>	
(cc. 1,5 di caglio)	56
<i>Idem esaurito con catalasi</i>	58

La determinazione dei controlli venne effettuata subito dopo il prelievo del latte.

TABELLA N. 12

pH iniziale del latte: 6,55 - Caglio tit. 1/10000 usato in dil. 1/10

	Resistenza al dinamometro
<i>Controllo con semina 1%</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	56
<i>Latte + H₂O₂ con semina 1%</i>	
(cc. 0,5 di caglio)	39
<i>Idem c.s. (cc. 1% di caglio)</i>	52
<i>Idem c.s. (cc. 1,5% di caglio)</i>	56
<i>Idem c.s. (cc. 2 % di caglio)</i>	61

La determinazione del controllo venne effettuata subito dopo il prelievo del latte.

Le ricerche precedentemente descritte e specialmente quelle riguardanti i caratteri del coagulo presamico, come s'è visto, si riferiscono a diverse modalità di esperienze nelle quali però l'acqua ossigenata veniva impiegata al 2 %. A quanti si erano precedentemente occupati dell'argomento ed anche a noi, tale dose era apparsa come la minima capace di risanare il latte e conservarlo per un lasso di tempo praticamente utile. Ma il criterio di conservabilità del latte destinato all'industria casearia, evidentemente non può essere uguale a quello seguito per il latte alimentare. Più che alla presenza di batteri patogeni (che nel corso della maturazione vengono distrutti, salvo che nei formaggi molli a brevissima conservazione) ed all'incremento dell'acidità

del latte, nelle applicazioni casearie si teme lo sviluppo di particolari batteri gasificanti e segnatamente degli anaerobi, che fanno sentire la loro azione nel corso della maturazione e determinano assai frequentemente delle alterazioni delle sostanze proteiche tali da deprezzare notevolmente il prodotto.

Tali agenti microbici di gonfiore precoce o tardivo e di alterazioni putrefattive, sono particolarmente sensibili all'azione dell' H_2O_2 sicchè è presumibile che anche dosi inferiori al 2 ‰ possano riuscire assai efficaci. Dobbiamo dire, per la verità, che a queste considerazioni siamo stati portati quando vennero a nostra conoscenza i numerosi tentativi d'ordine pratico compiuti da alcuni tecnici che, per le ragioni esposte nelle prime righe di questo scritto, avevano usato acqua ossigenata allo scopo di ridurre od annullare le fallanze che tanto facilmente si riscontrano nel corso della preparazione del formaggio grana. In tali applicazioni, svoltesi per lo più con grande riserbo rispetto ai proprietari dei caseifici, le dosi di H_2O_2 variarono dal 0,25 all'1 ‰, impiegate con modalità diverse, tra le quali ad esempio aggiungendo l' H_2O_2 soltanto al latte della sera, che al mattino seguente veniva mescolato con quello appena munto. Le dosi, a quanto si è potuto appurare, variavano caso per caso a seconda della stagione e della durata della conservazione, ma — ripetiamo — sono state contenute nei limiti sopradetti.

I risultati ottenuti sopra partite di formaggio grana esaminate dopo diversi mesi dalla loro preparazione, sembrano di piena soddisfazione. Queste notizie ci hanno indotto a compiere una nuova serie di determinazioni della resistenza del coagulo alla rottura, usando latte trattato con dosi di 0,5 ‰ ed 1 ‰.

TABELLA N. 13

I campioni trattati con H_2O_2 vennero tenuti in termostato a 28°C dopo il trattamento per 15 h. 40'.

Acidità iniziale: 12° Dornic

RESISTENZA ALLA ROTTURA DEI COAGULI

Controllo (A) R (resistenza) = 42		
» (B) R = 44		Caglio 0,5 cc. – fermenti 1%
Latte trattato con 0,5 p. 1000	R = 55	idem c.s.
» » » 1 p. 1000	R = 47	idem c.s.
» » » 1,5 p. 1000 (A)	R = 39	
» » » 1,5 p. 1000 (B)	R = 42	idem c.s.

Venne inoltre effettuata una prova per controllare la crescita dei fermenti lattici in latte trattato con diverse percentuali di H_2O_2 dopo 48 h. dal trattamento.

Vennero seminati in doppio un ceppo di *Thermobacterium helveticum* ed uno di *Streptococcus thermophilus* su latte trattato con 0,5 - 1,0 - 1,5 e 2 ‰ di H_2O_2 . L'osservazione dei coaguli si fece a 24 h. dalla semina.

CAMPIONI SEMINATI CON *THERMOBACTERIUM HELVETICUM*

0,5 p. 1000	Coagulato.	Coagulo un po' molle ma normale, senza siero
1,0 » » »		Coagulo un po' molle, normale, senza siero
1,5 » » »		Coagulo molto molle, con qualche spaccatura e presenza di siero
2,0 » »	Non coagulato.	

CAMPIONI SEMINATI CON *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

0,5 p. 1000	Coagulato.	Coagulo normale, un po' molle, senza siero
1,0 » » »		Coagulo normale, un po' molle, senza siero
1,5 » » »		Presenza abbondante di siero. Pezzi di coagulo rotto sparsi nel siero
2,0 » »	Non coagulato.	

TABELLA N. 14

Il latte trattato con H ₂ O ₂ venne tenuto in termostato a 25°C dopo il trattamento per 15 h. 30'. Caglio tit. 1/10000 usato in diluizione 1 : 10	<i>Acidità iniziale del latte: 13° Dornic</i>
	<i>Acidità dopo 15 h. 30' dal trattamento</i>
	Campione trattato con 1 p.1000 13,5° Dornic
	» » » 0,5 p. 1000 14° Dornic H ₂ O ₂ assente dopo 15 h. 30'

RESISTENZA ALLA ROTTURA DEI COAGULI

Controllo (A) R = 38	
» (B) R = 42	Caglio diluiz. 1: 10 0,5 cc. – Fermenti lattici 1%
Latte trattato con 1 p. 1000 H ₂ O ₂ (A) R = 46	caglio 0,5 cc – Fermenti 1%
Latte trattato con 1 p. 1000 H ₂ O ₂ (B) R = 61	caglio 1 cc – Fermenti 1%
Latte trattato con 0,5 p. 1000 H ₂ O ₂ (A) R = 57	caglio 0,5 cc – Fermenti 1%
Latte trattato con 0,5 p. 1000 H ₂ O ₂ (B) R = 63	caglio 1 cc – Fermenti 1%

TABELLA N. 15

I campioni trattati con H ₂ O ₂ vennero tenuti in termostato a 28°C dopo il trattamento per 16 h. 30'	<i>Acidità iniziale = 12° Dornic</i>
	<i>Acidità dopo 16 h. 30' dal trattamento</i>
	Latte trattato con 0,5 p. 1000 13° Dornic
	» » » 1 p. 1000 12,5° Dornic » » » 2 p. 1000 12° Dornic
Latte trattato con 0,5 p. 1000	pH = 6,50 – 6,55
» » » 1 p. 1000	pH = 6,55 – 6,60
» » » 2 p. 1000	pH = 6,65 – 6,70

Controllo (A)	R = 41				
» (B)	R = 43			caglio 0,5 cc – Fermenti 1%	
Latte trattato con 0,5	p. 1000 (A)	R = 61			
» » » 0,5	p. 1000 (B)	R = 65		caglio 0,5 cc – Fermenti 1%	
Latte trattato con 1	p. 1000 (A)	R = 54			
» » » 1	p. 1000 (B)	R = 57		caglio 0,5 cc – Fermenti 1%	
Latte trattato con 2	p. 1000 (A)	R = 32			
» » » 2	p. 1000 (B)	R = 34		caglio 0,5 cc – Fermenti 1%	

Dalle sopradette prove orientative risulterebbe che a parità di quantità di caglio il trattamento con dosi di 0,5 ed 1‰, anzichè far diminuire la tenacità del coagulo la esalterebbe (specialmente la dose di 05 ‰). Andamento dell'acidità ed attitudine allo sviluppo dei batteri lattici tipici appaiono, come era da attendersi, inversamente proporzionali alla quantità di H₂O₂ impiegata.

E' sembrato opportuno esaminare inoltre le caratteristiche del siero risultante dalla coagulazione presamica di campioni di latte trattato con dosi crescenti di H₂O₂.

Latte normale venne trattato con le dosi di 0,25 - 0,50 - 0,75 - 1 - 1,5 e 2 ‰ di H₂O₂ a 130 vol. Dopo una permanenza in termostato a 30°C per 16 ore, si procedeva alla coagulazione con 0,5 cc. di caglio liquido (titolo 1/10000), diluito all' 1:10. Dopo 40' a 35°C si determinava la resistenza alla rottura, il coagulo rotto veniva filtrato per garza. Si procedeva alla misurazione del siero dopo tre ore di filtrazione e su di esso si determinavano il residuo secco, gli zuccheri e l'azoto totale.

I risultati ottenuti sono raccolti nella seguente tabella N. 16.

TABELLA N. 16

Trattamento del latte	Resistenza alla rottura	Quantità del siero raccolto cc	Residuo secco % in vol.	Azoto totale del siero % in vol.	Zuccheri totali del siero espressi come lattosio % in vol.	Acidità del siero Dornic
Controllo	43-46 (in doppio)	175	6,58	0,1391	5,0075	7,5°
0,25 p. 1000	53	178	6,48	0,1426	5,0075	11,5°
0,50 p. 1000	52	177	6,60	0,1476	4,9525	9°
0,75 p. 1000	46	180	6,63	0,1441	5,0075	8°
1 p. 1000	43	179	6,62	0,1500	4,9525	8°
1,5 p. 1000	32	176	6,62	0,1566	4,9525	8°
2 p. 1000	32	178	6,60	0,1490	4,9525	7,5°

Da essi risulta confermato l'andamento della tenacità del coagulo che si dimostra incrementato dalle piccole dosi di H_2O_2 (0,5 - 1 p. 1000) e diminuito dalle dosi di 1,5 e 2 p. 1000. La quantità di siero non risulta variata dal trattamento alle varie dosi e così pure il residuo secco. L'azoto totale e gli zuccheri dosabili nei sieri provenienti dai diversi coaguli non sono stati influenzati sensibilmente dal trattamento con H_2O_2 .

Questi risultati andranno ancora approfonditi e particolarmente vanno completate le esperienze che abbiamo in corso, al fine di valutare l'azione dell' H_2O_2 sui gassificanti anaerobi sporigeni del latte. Comunque, va rilevato il risultato fin d'ora acquisito circa le qualità di tenacità del coagulo presamico derivante dal latte trattato con dosi del 0,5 ed %, che dimostra come in queste condizioni non sia nemmeno necessario di ricorrere a maggiori quantità di presame per ottenere una cagliata regolare, come è invece il caso quando si faccia uso di dosi del 2 e 3 p. 1000 di H_2O_2 .

CONCLUSIONI

Risulta dalle ricerche nostre e da quelle degli Autori che ci hanno preceduto che:

- a) il trattamento del latte vaccino con il 2 % di acqua ossigenata elettrolitica pura a 130 vol. consegue una riduzione della carica microbica iniziale;
- b) la riduzione della carica batterica e quindi la conservazione del latte, sono tanto più efficacemente ottenute quanto meno ricca è la microflora iniziale e perciò i migliori risultati si ottengono con l'aggiunta dell' H_2O_2 appena compiuta la mungitura;
- c) il massimo della riduzione si osserva mediamente dopo 12-15 ore dal trattamento, mentre nei tempi successivi la microflora del latte ossigenato tende ad aumentare con andamento e velocità che sono dipendenti dalla carica microbica iniziale;
- d) il trattamento con H_2O_2 non induce nel latte alterazioni nei riguardi del patrimonio vitaminico ed enzimatico, escluse: perossidasi, catalasi, reductasi che vengono distrutte, nè variazioni nella sua costituzione chimico-fisica, per quanto è rilevabile attraverso misure di densità, viscosità ed al rilevamento dell'indice crioscopico, dell'indice di rifrazione del siero, dell'indice di Polenske.

Dalle nostre ricerche rivolte allo studio del latte vaccino trattato con H_2O_2 nei riguardi delle sue proprietà ed attitudini interessanti il caseificio, sono emersi i seguenti rilievi:

- 1) l'acqua ossigenata aggiunta al latte nelle dosi del 2 % e superiori esplica una influenza sul coagulo presamico, diminuendone la tenacità. Tale azione è da attribuirsi ad una residua azione ostacolante sulla moltiplicazione dei batteri lattici e quindi sull'incremento dell'acidità, nonchè ad un'azione ritardatrice di natura poco chiara sul presame. Viceversa l'aggiunta di quantità di H_2O_2 a 130 vol. fra lo 0,5 e l'1 % esplica una favorevole azione sul coagulo presamico aumentandone in notevole misura la tenacità.

- 2) A pari condizioni di acidità per latte normale di controllo e latte ossigenato al 2 %, l'uso di quantità doppie di presame consente di compensare l'azione ritardatrice sul presame e permette l'ottenimento di un coagulo normale.
- 3) L'impiego di dosi di presame fra il doppio e il triplo della norma, unitamente all'aggiunta dell'1 % di culture di batteri lattici, consente di compensare contemporaneamente l'azione ritardatrice che l'aggiunta dell' H₂O₂ esercita sul presame e la eventuale residua attività ostacolante sulla moltiplicazione dei batteri lattici.
- 4) L'uso di catalasi esercita una influenza di per sè sola positiva, indipendente cioè dall'aumento della quantità di presame, nel caso che il latte ossigenato e trattato con catalasi venga seminato con il 2 % di culture di batteri lattici e sottoposto ad una incubazione di 4-6 ore dopo la semina.
- 5) Regolando la quantità di presame (a titolo sicuramente controllato), l'acidità del latte al momento della coagulazione, la quantità di fermenti lattici aggiunti sotto forma di culture di batteri lattici, con latte precedentemente trattato con acqua ossigenata anche alla dose del 2 % ma nel quale questa sia stata scomposta vuoi con catalasi, vuoi lasciando trascorrere il tempo necessario, si può ottenere un coagulo presamico che presenta caratteri normali, nei riguardi della tenacità.
- 6) Il trattamento del latte alla mungitura con dosi dal 0,5 all'1 % di H₂O₂ a 130 vol. — dosi in molti casi sufficienti per la buona conservazione tecnologica del latte da caseificare — non modifica le proprietà di coagulabilità del latte. Impiegando dosi normali di caglio, previa aggiunta di culture pure di fermenti lattici, si ottiene infatti un coagulo presamico che presenta caratteri di tenacità normali od anche superiori alla norma.

RÉSUMÉ

Les recherches évécutées portent sur l'étude du lait de vache traité avec de l' H₂O₂ pure à 130 vol. électrolytique, par rapport à ses propriétés et aptitudes intéressant la fromagerie. Des épreuves évécutées ressortent les données suivantes.

- 1) L'eau oxygénée ajoutée au lait à la dose de 2 % et plus exerce une influence sur le caillot de présure, dont elle diminue la ténacité. Il faut attribuer cette influence à une activité résiduelle, obstruant la multiplication des bactéries lactiques et par conséquent, l'augmentation de l'acidité; il y aurait en outre une action de retardement expliquée sur la présure, dont la nature n'est pas encore décélable. Au contraire, l'addition de H₂O₂ à 130 vol. à une dose entre 0,5 et 1 % explique une action favorable sur le caillot de présure, dont la ténacité est notablement augmentée.
- 2) À parité de conditions d'acidité du lait normal témoin et du lait oxygéné à 2 %, l'emploi d'une double quantité de présure permet de compenser l'action de retardement expliquée sur la présure et d'obtenir un caillot normal.

- 3) L'emploi de doses de présure entre le double et le triple du normal, en même temps qu'une quantité de cultures de bactéries lactiques de 1%, consentent de compenser soit l'action de retardement expliquée sur la présure par l'addition de l' H_2O_2 , soit l'éventuelle activité résiduelle obstruant la multiplication des bactéries lactiques.
- 4) En employant de la catalase on obtient d'elle une influence positive, qui est indépendante de l'augmentation de la quantité de présure, dans le cas où le lait oxygéné et additionné de catalase soit ensencé avec le 2% de cultures de bactéries lactiques et soumis à une incubation de 4-6 heures après l'ensemencement.
- 5) En réglant la quantité de présure (à titre sûrement contrôlé), l'acidité du lait au moment de la coagulation et la quantité de ferments lactiques additionnés sous forme de cultures de bactéries lactiques, avec du lait précédemment traité par de l'eau oxygénée, même à la dose de 2%, mais où elle ait été décomposée soit par de la catalase, soit en laissant s'écouler le temps nécessaire à tel but, on peut obtenir un caillot de présure qui présente des caractéristiques normales pour ce qui se rapporte à la ténacité.
- 6) Le traitement du lait à la traite par des doses entre 0,5 et 1% de H_2O_2 à 130 vol. (doses qui sont suffisantes dans beaucoup de cas pour la bonne conservation technologique du lait à employer en fromagerie), ne modifie pas les propriétés de coagulabilité du lait. En employant des doses normales de présure, avec addition préalable de cultures pures de ferments lactiques, l'on obtient en effet un caillot de présure qui présente des caractéristiques de ténacité normales, ou même supérieures au normal.

SUMMARY

From the researches carried out and concerning the study of cow milk treated with electrolytic pure H_2O_2 at 130 vol., according to his properties and aptitudes interesting cheese production, it appears that:

- 1) Oxygenated water if adjoined to the milk at a dose of 2% and more, is able to display an influence on the rennet clot, whose tenacity becomes diminished. This action is to be attributed to a residual activity who hinders the multiplication of lactic bacteria and therefore the increase of acidity; besides there is an other action of retardement on the rennet, whose nature is not yet detectable. On the contrary, the adjunction of H_2O_2 at 130 vol. in a quantity between 0,5 and 1% determines a favourable action on the rennet clot, whose tenacity is notably augmented.
- 2) At parity of acidity conditions for normal control milk and for milk oxygenated at 2%, the use of a double quantity of rennet allows to compensate the action of retardement displayed on the rennet and to obtain a normal clot.
- 3) The use of rennet in a quantity between the double and the triple of the normal quantity, with a contemporary adjunction of 1% lactic bacteria cultures, allows to compensate both the action of retardement

on the rennet (determined by H_2O_2) and the eventual residual activity, hindering the multiplication of lactic bacteria.

- 4) With the employment of catalase it is possible to obtain a positive influence, which is independent from the augmentation of rennet quantity, if cultures of lactic bacteria are adjuncted in a quantity of 2 % to the milk, previously treated with H_2O_2 and catalase and then incubated for 4-6 hours.
- 5) If we regulate the rennet quantity (whose title must be surely controlled), the milk acidity at the time of coagulation and also the quantity of lactic ferments which are adjuncted in form of lactic bacteria cultures, with a milk previously treated with a dose of 2 % of oxygenated water (to be decomposed either by catalase or by leaving lapse the necessary time), it is possible to obtain a rennet clot with normal tenacity.
- 6) With a treatment of milk after milking with H_2O_2 at 130 vol. in doses between 0,5 and 1 ‰ (doses which are sufficient in most cases for a technologically good preservation of milk to be destined for cheese production) the coagulability properties of milk are not modified. With normal doses of rennet and previous adjunction of pure lactic ferments cultures, we obtain in effect a rennet clot whose characters of tenacity are normal or even superior to the normal.

Sovra le attività dei Flavobacteri, nei confronti dell'acido benzoico e di alcuni fenoli

R. Treccani Benetti

A. Schiesser

Le proprietà fisiologiche ed in particolare il potere ossidante dei microrganismi appartenenti al genere *Flavobacterium* sugli steroli e la capacità di alcuni ceppi di utilizzare sostanze organiche diverse, quali i glucidi, i poli-alcoli, gli stessi idrocarburi e derivati, sono già state più volte segnalate (1). E' parso pertanto interessante studiare il comportamento di alcuni ceppi in terreni sintetici aggiunti di acido benzoico, acido salicilico, resorcina, pirocatechina e fluoroglucina, nel duplice intento di stabilire se i diversi ceppi avessero su tali sostanze un comportamento analogo e di chiarire il meccanismo di azione.

Si è potuto stabilire che esiste una specificità dei diversi microrganismi nei confronti delle diverse sostanze in esame. Alcuni di essi sono in grado di utilizzarle come fonte di carbonio, in assenza di sostanze di più facile attacco, mentre in presenza di alcune sostanze della serie grassa, quali l'acetato di sodio, il glucosio, ecc. in piccole quantità, alcuni possono formare una sostanza bruno-nera. Ulteriori ricerche condotte su uno dei ceppi (AR₁) hanno permesso di stabilire che le proprietà e le caratteristiche di tale sostanza bruna sono molto simili a quelle delle sostanze umiche del terreno.

PARTE SPERIMENTALE

Caratteristiche morfologiche e culturali dei ceppi isolati

- AR₁ bastoncino $1,25 \times 1,8 \mu$, immobile, gram dubbio, non acido resistente, non produce indolo, non riduce i nitrati, non forma H₂S. Forma tracce di catalasi. Acidifica molto debolmente: glucosio, maltosio, saccarosio senza formazione di gas, non utilizza: lattosio, xilosio e glicerina. Probabilmente identificabile con *Flav. Flavotennae* Ehringer and Mondin. isolato dall'aria.
- AR₃ bastoncino $0,9 \times 1,2 \mu$, immobile, grampositivo, non acidoresistente, non produce indolo, non riduce i nitrati, forma tracce di H₂S. Produce catalasi in piccola quantità. Produce acido, ma non gas da glucosio, maltosio, saccarosio; cresce, ma non dà acido in presenza di lattosio e xilosio, non utilizza la glicerina. Isolato dall'aria: *Flavobacterium maris* Harrison.

- AR6 bastoncino $0,8 \times 1,7 \mu$, gram dubbio, non acidoresistente, non produce indolo, non riduce i nitrati; non forma H_2S . Produce notevoli quantità di catalasi. Acidifica debolmente, ma non produce gas da glucosio, saccarosio, maltosio, non utilizza, lattosio, xilosio e glicerina: *Flav. aurantiacum* Bergey et al., isolato dall'aria.
- AC5 bastoncino $0,8 \times 1,2 \mu$, immobile, gram dubbio, non acidoresistente, non produce indolo, forma nitriti dai nitrati, non forma H_2S . Produce tracce di catalasi. Produce acido, ma non gas da glucosio, saccarosio, maltosio, xilosio, glicerina, non dà acido da lattosio. Isolato da acqua. Non identificato.
- T3 bastoncino $1,5 \times 1,3 \mu$, grampositivo, non acidoresistente, non produce indolo, riduce i nitrati a nitriti, non forma H_2S . Produce acido ma non gas da glucosio e saccarosio, non dà acido da maltosio e lattosio, non utilizza xilosio e glicerina. Isolato da terra coltivata. Non identificato.
- I caratteri culturali sono riportati nella Tab. I.

**C O N S O R Z I O
P R O D U T T O R I
L A T T E D I M I L A N O**

primo esempio di un organismo volontario sorto in Italia per incrementare la produzione lattiera e per attuare norme e direttive tecniche-igieniche nei rapporti del problema del "buon latte", da destinarsi ai rifornimenti dei maggiori centri urbani.

*Soltanto un macchinario moderno
consente una lavorazione razionale*

BRAP

- Impianti completi per tutte le lavorazioni del latte
- Elettropompe Triumphator
- Scrematrici Triumphator
- Tele ritorte Morgenthaler
- Tele industriali

BRAP - Corso Milano 12a - Tel. 4019 - MONZA

CENTRO SPERIMENTALE DEL LATTE



- Fermenti selezionati per tutti i formaggi tipici
- Culture acidificanti ed aromatizzanti per burro
- Tutte le analisi microbiologiche e chimiche del latte e dei latticini
- Muffe selezionate per gorgonzola
- Consulenze tecniche scientifiche per l'industria lattiero casearia

MILANO - PARCO RAVIZZA - VIA SALASCO, 4 - TEL. 51.208 - 50.715

TABELLA I

Ceppo	Agar comune	Brodo comune	Agar lievito	Brodo lievito	Latte al tornasole	Patata	Gelatina
AR 1	+ Giallo limone	+ - Deposito giallo	+ Giallo arancio	+ - Pigm. in superf.	Acido	+ - Giallo pallido	Non fluidifica
AR 3	+ + Giallo arancio	+ + Pigm. in superf.	+ Giallo arancio	+ + Pigm. in superf.	Alcalino	+ + Giallo arancio	Non fluidifica
AR 6	+ + Arancio rosato	+ Deposito arancio	-	-	Inalterato	-	Non fluidifica
AC 5	+ Giallo intenso	+ Deposito giallo fiocc.	+ + Giallo	+ Pigm. in superf.	Alcalino	+ + Giallo bruno	Non fluidifica
T 3	+ Giallo oro int.	+ Deposito giallo	+ + Giallo oro int.	-	Inalterato	+ Giallo oro int.	Non fluidifica

Comportamento dei ceppi in esame in terreno sintetico con acido salicilico, benzoico, resorcina, pirocatechina e fluoroglucina, come unica fonte di carbonio.

I 5 ceppi vennero seminati in un terreno sintetico (*) contenente l'acido benzoico o i vari fenoli nella concentrazione dell'1 %. Le culture eseguite con la tecnica degli ingrandimenti (2) vennero tenute in osservazione per 40 giorni. Come risulta dai dati riportati nella tabella II, il comportamento dei singoli ceppi nei confronti delle varie sostanze saggiate diversifica notevolmente.

TABELLA II

	AR1	AR3	AR6	AC5	T3
controllo	—	—	—	—	—
salic. Na	+++	+	+++	+±	+++
benzoato Na	++	+++	—	++	+++
resorcina	—	++	+	—	±
pirocatechina	±	++	+	—	+
fluoroglucina	—	—	±	—	±

In colture di 40 giorni di AR₁ con salicilato di Na, la reazione dell'acido salicilico con cloruro ferrico risulta negativa.

Nell'intento di chiarire il meccanismo di tale attacco, ulteriori ricerche vennero condotte sul ceppo ARI.

Comportamento del ceppo ARI in terreno sintetico, con aggiunta di acido benzoico e dei vari fenoli, in presenza di altre sostanze organiche.

I risultati della precedente esperienza dimostrano che in assenza di altre fonti di carbonio il ceppo ARI è in grado di utilizzare l'acido salicilico e benzoico e non la resorcina, la pirocatechina e la fluoroglucina. Allo scopo di stabilire se un attacco di tali sostanze potesse aver luogo in presenza di altre fonti di carbonio, nel terreno sintetico contenente le sostanze già precedentemente saggiate, vennero aggiunti rispettivamente: glucosio, succinato, tartrato, formiato, citrato, lattato, acetato, malato e fumarato di Na, nella concentrazione dell'1 %.

In queste condizioni il microrganismo in genere ha uno sviluppo ottimale, tranne che in presenza di resorcina. La presenza di acido malico, acido fumarico, citrato, lattato e acetato di sodio determina nelle culture con pirocatechina la formazione di una sostanza intensamente colorata in bruno,

(*) KH₂PO₄ gr. 1, NH₄NO₃ gr. 1, MgSO₄.7H₂O gr. 1.
H₂O → 1000 cc. — pH = 6,8 - 6,9.

tale sostanza si forma anche nelle culture con fluoroglucina e salicilato in presenza di acetato di sodio. Una colorazione giallastra più o meno intensa si nota anche nelle altre culture.

Tale colorazione è probabilmente legata ad un attacco ossidativo di alcune delle sostanze in esame che ha luogo solo in presenza di un'altra fonte di carbonio della serie grassa.

La formazione di tale sostanza non è legata al pH della cultura.

Estrazione e proprietà della sostanza nera

Due palloni contenenti 2 litri e $\frac{1}{2}$ di soluzione salina e salicilato di Na nella concentrazione dell'1 %, rispettivamente con e senza acetato di Na (1 %) vennero insemenzati con una cultura di AR1 e incubati a 30°C. per 3 mesi. Dopo tale periodo la reazione del salicilato con cloruro ferrico è positiva in assenza di acetato e negativa in presenza di acetato. Le culture vennero concentrate nel vuoto sino a 700 cc. circa ed estratte ripetutamente con etere in ambiente acido.

Nella cultura senza acetato si estrae circa 2/3 dell'acido salicilico presente in partenza.

Il residuo dell'estrazione della cultura con acetato, venne precipitato con CHI concentrato a caldo. Il precipitato ha le seguenti caratteristiche: insolubile in alcool a freddo, all'ebollizione si sciogliono tracce, insolubile in alcool metilico a freddo, all'ebollizione si sciogliono tracce, insolubile in acetone, in etere di petrolio, in etere, in cloroformio, benzina, sia a caldo che a freddo. Solubile leggermente a freddo nella piridina, più solubile a caldo, solubilissimo negli alcali diluiti a freddo, con colorazione bruno rossastra, bruno nera, a secondo della concentrazione solubile in HNO₃ conc. con colorazione rosso bruna: diluendo si ha un precipitato fioccoso bruno, solubile in acetone, poco in etere.

Da tali caratteristiche la sostanza pare identificabile con la sostanza unica del terreno.

Le medesime caratteristiche possiede la sostanza nera, ottenuta per precipitazione in ambiente acido dalle culture contenenti oltre a fluoroglucina o pirocatechina, acetato di sodio.

RIASSUNTO

Sono stati isolati alcuni microorganismi appartenenti al genere Flavobacterium di cui vengono riportate le caratteristiche morfologiche e culturali. Alcuni di essi possono utilizzare l'acido benzoico o determinati fenoli in assenza di altre fonti di carbonio.

In presenza di acetato o di altre sostanze della serie grassa, alcuni formano una sostanza bruno-nera le cui caratteristiche sono molto simili a quelle della sostanza unica del terreno.

SUMMARY

Some microorganisms belonging to the Flavobacterium genus have been isolated and their cultural and morfogical properties have been specified in our researches. Some of the above microorganisms are able to utilize benzoic acid or certain phenol compounds as exclusive source of carbon.

Adding to the cultures sodium acetate or other substances some of the bacteria will form a substance of black-brown colour having characteristics similar to the humic substance of soil.

BIBLIOGRAFIA

- (1) C. Arnaudi: « Boll. I.S.M. », Vol. XXIII, 1944 - « Experientia », Vol. (1/4 1946).
- (2) V. Treccani, C. Colla: « Ann. Micr. », Vol. III, p. 198, 1947.

VII° Congresso Nazionale di Microbiologia

Per iniziativa della SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA nel prossimo mese di ottobre verrà indetto in Roma il VII° Congresso Nazionale di Microbiologia.

I temi e i relatori sono i seguenti:

- 1) Fattori di accrescimento dei microbi.
Relatori Prof. LUIGI CALIFANO e ALDO CIMINO
- 2) Aspetti Biologici di alcuni ultravirus in rapporto al loro impiego a scopo vaccinale nel campo veterinario.
Relatore: Prof. VITTORIO CILLI
- 3) Attività e caratteri dei microrganismi agenti di biossidazione.
Relatore: Prof. CARLO ARNAUDI

Verranno accettate soltanto comunicazioni inerenti ai temi in relazione.

A tempo debito verrà inviato il programma definitivo.

Per qualsiasi informazione rivolgersi al Segretario Generale della Società:

Prof. G. PENSO - ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Viale Regina Margherita, 299 - Roma

STAMPATO COI TIPI DELLA
TIPOGRAFICA M I L A N E S E
VIA FARINI, 5 - TEL. 67.916