

Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab.

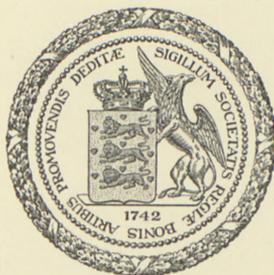
Biologiske Skrifter, Bind I, Nr. 2.

ÜBER FAKTOREN, WELCHE AKTIVIEREND
ODER HEMMEND AUF DIE ENTWICKELUNG
DER MILCHSÄUREBAKTERIEN WIRKEN

WORAUS BESTEHT DAS MILCHBIOS?

VON

S. ORLA-JENSEN UND AGNETE SNOG-KJÆR



KØBENHAVN

EJNAR MUNKSGAARD

1940

Det Kongelige Danske Videnskabsnævn Sekretat.

Biologiske Skrifter, Bind I, Nr. 2.

ÖBER FAKTOREN, WELCHE AKTIVIEREND
ODER HEMMEND AUF DIE ENTWICKELUNG
DER MILCHSÄUREBAKTERIEN WIRKEN

WORAUS BESTEHT DAS MILCHBIOS?

VON

S. ORLA-JENSEN und AGNETE SNOG-KJER



PRINTED IN DENMARK
BIANCO LUNOS BOGTRYKKERI A/S, KBHVN.

Über Faktoren, welche die Entwicklung der Milchsäurebakterien fördern oder hemmen

ÜBER FAKTOREN, WELCHE AKTIVIEREND
ODER HEMMEND AUF DIE ENTWICKELUNG DER
MILCHSÄUREBAKTERIEN WIRKEN

In einer früheren Arbeit¹ haben wir gezeigt, dass die Milchsäurebakterien wenigstens zweier Wuchsstoffe bedürfen: des Laktoflavins und einer biosähnlichen Substanz, die, wie wir später zeigen werden, aus anderen Bestandteilen zusammengesetzt ist als das Bios der Hefe.

In Anknüpfung an diese Arbeit zeigten wir, dass verschiedene in der Bakteriologie verwendete Peptone Laktoflavin in grösserer Menge, Bios dagegen nur in geringerer Menge enthalten. Wir haben ferner gezeigt, dass das in den Peptonen vorhandene Laktoflavin von den für die Peptonisierung verwendeten Enzympräparaten herrührt. Bei der Weiterführung dieser Arbeit lag es nahe zu untersuchen, ob die das Wachstum der Milchsäurebakterien aktivierende Wirkung, welche viele Extrakte von Pflanzen und tierischem Gewebe aufweisen, hauptsächlich vom Laktoflavin oder vom Bios herrührt. Für diese Untersuchungen verwendeten wir bevorzugt Milch, der mittels aktiver Kohle die Wuchsstoffe der Milchsäurebakterien entzogen waren. Dieses Substrat reagiert prompt auf jeden Aktivator, da es alle nötigen Nährstoffe enthält. Wenn solche Milch durch Zusatz eines Extraktes gegenüber Milchsäurebakterien reaktiviert wird, enthält dieser Extrakt sowohl Laktoflavin als Bios; wenn diese Milch dagegen nur durch Zusatz von Laktoflavin oder Bios reaktiviert wird, enthält der Extrakt nur Bios beziehungsweise Laktoflavin. Folgende Extrakte wurden in dieser Weise geprüft:

1. Asparaginmutterlauge als Rest eines Extrakts von Lupinkeimen (*Lupinus albus*). Der Extrakt war von den Difco-Laboratorien (Detroit) zwecks Herstellung von Asparagin bereitet worden. Er ergab ein Asparagin, das günstig auf das Wachstum verschiedener Bakterien einwirkte. Da durch weitere Reinigung des Asparagins die aktivierende Wirkung verloren ging, muss sie wohl auf die in der Mutterlauge zurückgebliebenen Verunreinigungen zurückzuführen sein. Als Kontrolle haben wir ausser reinem Asparagin auch noch eine Mischung von Asparagin und Cystein geprüft, weil die Mutterlauge auch letztere für das Wachstum sehr wichtige Aminosäure enthielt. Endlich haben wir noch Cystein für sich allein geprüft. Der N-Gehalt der Mutterlauge war 7,82 %.

¹ The Vitamin and Nitrogen Requirements of the Lactic Acid Bacteria. D. Kgl. Danske Vidensk. Selskab, Skrifter, naturv. og math. Afd. 9. VI. 5, 1936.

Der Vitaminbedarf der Milchsäurebakterien. Zentralblatt für Bakteriologie. II. Abt. 1936, Bd. 94, S. 434—477.

2. Kartoffelextrakt nach SCHNELL, TATUM und PETERSON (Journal of Bacteriology 1937, Bd. 33, S. 207). Die gewaschenen Kartoffeln wurden in der Fleischhackmaschine zerkleinert und mit Hilfe einer Buchnerpresse ausgepresst. Der Presssaft wurde nach der Sterilisation durch Filtration von koaguliertem Eiweiss befreit und auf einen N-Gehalt von 1,42 % eingengt.
3. Maisextrakt nach FROMAGEOT und PIRET (Archiv für Mikrobiologie, 1936, Bd. 7, S. 551). Der zerquetschte Mais wurde mit der zwanzigfachen Menge Wasser eine Stunde bei 120° C autoklaviert, und der Extrakt nach fünftägigem Stehen im Kühlschrank abzentrifugiert. Durch Fällung mit Alkohol wurde der Extrakt von Stärke befreit. Nach dem Abdestillieren des Alkohols und weiterem Stehen im Kühlschrank wurde das Filtrat nochmals filtriert und auf 0,15 % N eingengt. Obwohl nur gezeigt worden ist, dass der so gewonnene Maisextrakt die für gewisse Propionsäurebakterien nötigen Wachstumsstoffe enthält, war es naheliegend zu prüfen, ob er nicht auch auf das Wachstum der Milchsäurebakterien günstig einwirkt.
4. Malzkeimextrakt, ein altbekannter, noch immer verwendeter Hefeaktivator, wurde zuerst von BERTRAND und DUCHAČEK (Biochemische Zeitschrift, 1909, Bd. 20, S. 100) zur Förderung des Wachstums von *Thermobacterium Jugurt* verwendet. Wir stellten ihn aus gemahlene Malzkeimen dar, die zuerst kalt extrahiert und dann nach dem Aufkochen abfiltriert wurden. Der Extrakt wurde auf 1,1 % N eingengt.
5. Tomatenpüree. MICKLE und BREED (1925) und später C. S. PEDERSON (1929) haben gezeigt, dass Tomatenpüree leicht von verschiedenen Milchsäurebakterien angegriffen wird (Technical Bulletin 110 und 150, N.Y. State Agricul. Experiment. Station, Geneva); daraus konnte man schliessen, dass dieses Substrat ein guter Nährboden für die Milchsäurebakterien ist. Wir haben italienisches Tomatenpüree (Fratelli Polli) mit 0,57 % N verwendet.
6. Luzerneextrakt. SADLER, EAGLES, BOWEN und WOOD (Canadian Journal of Research 1936, S. 139) haben gezeigt, dass Luzerneextrakt ein guter Aktivator für Milchsäurebakterien und ganz besonders für Betakokken ist. Wir stellten den Extrakt aus Luzernemehl in ähnlicher Weise wie den Malzkeimextrakt dar und engten ihn auf 0,7 % N ein.
7. Hefeextrakt ist wie Malzkeimextrakt ein in der Gärungsindustrie altbewährter Aktivator sowohl für Hefe wie für *Thermobacterium cereale*. Für unseren Zweck haben wir Presshefe verwendet, die drei Stunden mit der fünffachen Menge Wasser auf dem Wasserbad extrahiert wurde. Nach kurzdauernder Erhitzung auf 115° C wurde die Hefe abzentrifugiert und der Extrakt auf 0,4 % N eingengt.
8. Kuhkotextrakt. Die stark aktivierende Wirkung von Kuhkotextrakt auf die Milchsäurebakterien ist von ORLA-JENSEN und JOHANNE JACOBSEN zuerst nachgewiesen worden (Zentralblatt f. Bakteriologie, 1930, II. Abt., Bd. 80, S. 321). Kuhkot wurde mit so viel Wasser verrührt, dass sich die festen Bestandteile abfiltrieren liessen; das Filtrat wurde auf 0,08 % N eingengt.

9. Pankreatin. In unserer oben zitierten Arbeit haben wir gezeigt, dass Pankreatin nicht nur wie andere Präparate proteolytischer Enzyme reich an Laktoflavin ist, sondern ausserdem auch etwas Bios enthält. Das von uns benutzte Präparat enthielt 10 % N.
10. Fleischextrakt. Fleischbrühe und Peptonlösungen mit Fleischextrakt gehören bekanntlich zu den in der Bakteriologie am häufigsten verwendeten Nährböden. Wir haben LIEBIGS Fleischextrakt mit 9,76 % N für unsere Untersuchungen verwendet.
11. Leberextrakt. Auch Leber und Leberextrakt werden häufig in der Bakteriologie und besonders zur Züchtung von anaëroben Bakterien angewandt. Zur Herstellung des Extraktes benutzten wir fein verriebene Ochsenleber, die in der Kälte mit der halben Gewichtsmenge Wasser extrahiert wurde. Der Extrakt wurde nach dem Aufkochen abgepresst und bis auf 4 % N eingengt.

Es fehlt uns leider ein Mass um die aktivierende Wirkung dieser Extrakte vergleichen zu können. Da die pflanzlichen Extrakte und auch Leberextrakt reich an unwirksamen Kohlehydraten sind, können wir nicht überall von denselben Mengen Trockensubstanz ausgehen. Da wasserlösliche Aktivatoren meistens N-haltig sind, haben wir der Milch mit den Extrakten stets dieselbe Menge N zugesetzt, nämlich 0,02 %, die mit Wasser zu 5 cm³ aufgefüllt war. Da diese Zusätze somit 0,4 % N enthielten, wurde der Stickstoffgehalt der Milch, der durchschnittlich 0,5 % betrug, durch 5 % der Zusätze nicht merkbar vermindert. Um nicht mehr als 5 % Zusatz zu verwenden, mussten wir im Falle der beiden sehr stickstoffarmen Extrakte von Mais und Kuhkot weniger nehmen als 0,02 % N entspricht. Dieser Fehler kann aber kaum erheblich sein, weil wir mit so reichlichen Aktivator Mengen arbeiten, dass etwas mehr oder weniger nicht zu spüren ist.

Ob unsere Extrakte auch thermolabile Aktivatoren enthielten, wurde nicht geprüft, da sie sowohl vor wie nach der Mischung mit der Milch sterilisiert wurden. Um ihre Wirkung so vollständig wie möglich zu untersuchen, wurden sie gegenüber mehreren Arten von Milchsäurebakterien mit äusserst verschiedenen Eigenschaften geprüft. Mit der verwendeten Versuchsanordnung können wir sie jedoch nur gegenüber solchen Milchsäurebakterien prüfen, die gut in Milch gedeihen.

Die Zahlen der folgenden Tabellen geben an wie viele Promilles Milchsäure die geprüften Bakterien bei ihrer Optimaltemperatur gebildet haben. Sie sind aus dem Durchschnittswert von 3—5 gleichzeitig geimpften Röhren berechnet. Der Zeitpunkt für die Titration ist von grosser Bedeutung: wir haben gefunden, dass ein vollständiger Parallelismus zwischen Bakterienzellen und Säuremenge nur nach beendeter Inkubationszeit, und bevor die Bakterien durch die Säurebildung abgeschwächt werden, vorliegt. Wenn man zu früh titriert, wird man bisweilen finden, dass die aktivierenden Stoffe das Wachstum und die Säurebildung eher gehemmt haben, was (wenigstens bei unreinen Aktivatoren wie Extrakten) dadurch zu erklären ist, dass diese Stoffe auch hemmende Substanzen enthalten, deren Wirkung erst

Bakterien	Marktmilch Nr. 1		Ohne Extrakt				
				Cystein	Cystein + Asparagin	Asparagin	Asparagin-mutterlauge
<i>Thermobacterium lactis</i> Nr. 9 nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.8	0.5	0.5	0.2	5.2
	» »	Mit Laktoflavin	0.7	0.7	0.9	0.2	5.0
	» »	Mit Bios	5.6	7.0	9.5	8.0	11.8
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	3.2	12.6	15.8	3.5	12.8
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	12.2	14.9	17.6	16.7	18.5
<i>Thermobacterium lactis</i> Nr. 10 nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.2	0.1	0.2	0.1	1.5
	» »	Mit Laktoflavin	0.4	0.5	0.5	0.1	1.6
	» »	Mit Bios	0.9	1.1	2.4	1.4	2.8
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	1.5	6.5	11.7	1.1	3.5
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	11.5	12.6	15.1	12.6	18.5
<i>Thermobacterium helveticum</i> nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.3	0.3	0.2	0.2	6.3
	» »	Mit Laktoflavin	1.2	1.6	0.5	0.5	6.1
	» »	Mit Bios	2.4	4.5	3.2	0.5	6.3
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	11.4	9.5	14.4	8.1	11.5
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	19.1	17.6	21.2	17.1	19.4
<i>Thermobacterium jugurt</i> nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.5	1.8	0.1	0.3	5.2
	» »	Mit Laktoflavin	0.7	3.8	2.0	0.9	5.2
	» »	Mit Bios	2.5	6.5	2.7	3.0	14.0
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	15.2	17.3	20.0	12.8	13.5
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	23.6	21.6	24.0	23.9	23.4
<i>Thermobacterium bulgaricum</i> nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.7	0.5	0.9	0.5	5.9
	» »	Mit Laktoflavin	0.9	0.7	0.9	0.6	5.9
	» »	Mit Bios	7.0	4.7	10.1	3.8	12.4
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	12.6	14.6	14.5	13.1	12.4
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	16.0	15.5	16.9	13.7	15.8
<i>Streptobacterium casei</i> Nr. 11 nach 96 Stunden bei 30° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	1.1	1.1	2.3	1.1	1.4
	» »	Mit Laktoflavin	1.1	2.0	1.8	1.1	1.4
	» »	Mit Bios	2.2	4.5	6.3	2.7	6.1
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	6.2	6.3	8.6	7.2	7.4
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	7.4	5.8	8.1	8.1	14.9
<i>Streptobacterium planatarum</i> Nr. 24 nach 96 Stunden bei 30° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	1.6	0.5	1.1	1.5	10.4
	» »	Mit Laktoflavin	1.6	0.9	1.1	1.6	9.7
	» »	Mit Bios	4.1	3.2	3.8	3.8	14.0
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	4.1	3.2	3.8	3.8	14.0
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	1.4	1.1	1.4	1.4	14.6
<i>Streptococcus thermophilus</i> Nr. 7 nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	1.0	0.9	1.0	0.7	5.6
	» »	Mit Laktoflavin	1.0	0.9	0.7	0.7	5.6
	» »	Mit Bios	5.3	3.4	5.9	5.0	6.8
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	5.9	3.6	5.9	6.1	7.0
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	8.6	3.6	6.5	8.1	9.5
<i>Streptococcus lactis</i> Nr. 22 nach 72 Stunden bei 30° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	0.9	0.9	0.9	0.8	6.1
	» »	Mit Laktoflavin	1.4	1.6	1.5	1.0	6.1
	» »	Mit Bios	4.1	4.1	4.7	3.8	7.2
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	5.9	5.6	5.2	6.1	7.2
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	7.2	6.1	5.4	7.0	7.4
<i>Streptococcus cremoris</i> Nr. 18 nach 120 Stunden bei 30° C.	Kohlebehandelt	Ohne Zusatz	1.0	0.2	0.5	0.9	5.0
	» »	Mit Laktoflavin	1.0	0.5	0.5	0.9	5.0
	» »	Mit Bios	3.4	2.7	2.7	4.1	5.2
	» »	Mit Laktoflavin+Bios	3.8	4.1	3.6	4.3	5.4
	Nicht kohlebehandelt	Ohne Zusatz	5.0	4.3	5.4	6.5	7.4

I.

Mit Extrakt oder Lösung von

Kartoffeln	Mais	Malzkeimen	Tomaten- püree	Luzerne	Hefe	Kuhkot	Pankreatin	Fleisch- extrakt	Leber
10.7	4.7	11.7	12.8	16.7	5.4	7.8	11.9	8.8	12.6
10.5	4.4	12.2	13.5	16.4	6.0	11.6	13.7	9.7	13.7
16.3	8.3	19.1	15.3	20.0	14.0	14.6	13.3	14.4	17.7
16.5	11.5	18.5	16.3	20.0	14.6	15.8	15.1	15.1	17.8
19.4	17.7	18.7	18.5	19.8	15.3	18.5	16.7	18.7	18.7
1.8	1.6	2.5	9.2	9.9	0.7	4.0	12.2	2.2	5.2
1.9	2.1	2.5	11.5	9.7	0.7	5.6	12.4	2.1	5.4
6.9	1.4	13.1	13.3	15.0	3.2	7.7	15.0	5.9	12.2
7.4	3.5	13.5	14.2	15.4	5.4	12.6	15.0	7.2	13.1
14.4	13.2	15.8	16.9	17.3	12.8	15.5	15.5	14.9	16.2
4.1	1.7	11.0	9.7	7.2	0.2	2.7	10.4	2.3	11.9
4.5	8.1	11.9	11.3	12.2	2.7	6.5	9.2	4.3	11.9
6.1	2.3	14.4	9.7	9.2	4.3	9.7	14.4	8.6	14.3
8.6	8.0	18.2	14.9	14.9	6.5	13.3	14.9	13.2	14.9
18.2	19.6	20.2	21.9	19.1	20.0	20.7	20.9	20.5	22.1
9.8	3.6	14.0	14.6	17.3	2.5	3.6	16.2	5.9	16.7
9.5	10.5	14.9	16.0	17.4	3.4	12.4	16.2	10.1	16.7
15.9	6.0	20.5	15.5	17.7	11.0	14.2	20.2	17.3	23.6
14.2	14.9	21.2	16.7	17.7	20.3	14.2	18.9	20.0	23.9
24.2	23.4	24.8	23.0	25.2	24.1	22.7	24.4	24.1	25.0
9.2	3.6	11.0	9.5	15.3	1.1	5.3	9.2	10.6	7.2
9.0	4.7	14.2	10.6	14.9	1.4	13.1	9.6	10.1	6.8
13.5	7.2	14.6	11.0	16.8	11.7	13.3	12.4	15.3	12.2
14.9	11.9	16.2	12.6	16.8	11.7	16.2	14.2	15.1	12.6
17.8	16.2	16.2	15.8	18.5	16.0	17.8	13.5	13.5	17.8
1.6	2.7	6.3	11.5	12.4	11.0	5.4	11.3	9.5	9.5
0.9	3.6	6.8	12.2	12.4	10.8	10.4	12.9	10.6	8.8
2.3	2.3	7.4	13.1	12.6	12.8	10.4	12.8	14.4	11.0
3.2	3.7	8.3	14.0	12.6	12.8	12.6	13.3	14.4	10.6
12.4	7.9	14.0	15.0	16.0	11.3	10.6	11.7	11.0	11.9
9.7	4.7	9.7	9.9	10.9	8.1	2.5	10.6	6.5	9.7
9.9	4.7	11.0	9.9	10.9	8.8	7.8	10.6	6.3	9.5
10.8	5.2	11.5	9.8	12.2	9.7	9.2	12.2	7.2	10.6
11.5	5.6	11.5	10.1	12.3	9.7	12.8	11.9	6.1	10.6
9.0	1.8	9.9	7.0	11.9	5.2	2.6	6.8	2.0	6.3
6.1	4.5	7.0	7.7	9.0	7.9	2.6	5.2	5.2	7.4
6.1	5.9	6.8	7.7	9.0	7.2	5.4	5.3	5.0	7.0
6.3	5.6	9.0	7.7	9.2	8.1	8.1	7.4	8.6	6.3
6.5	7.0	8.3	7.9	9.0	7.4	8.0	7.3	8.8	6.3
9.0	8.3	9.2	8.3	10.4	9.9	8.3	8.3	9.9	9.9
6.3	3.2	6.1	6.5	6.5	5.2	3.2	5.2	4.5	5.4
6.5	5.2	5.9	6.8	6.8	6.3	4.3	5.9	6.1	5.4
7.4	4.3	6.5	7.0	7.2	6.5	4.5	7.2	5.4	6.3
7.7	6.2	6.8	7.4	7.4	7.4	6.1	7.2	6.8	6.3
8.3	6.8	7.0	7.9	7.7	7.7	7.0	7.2	7.4	7.2
5.2	1.9	5.9	5.6	5.4	3.4	1.6	3.7	1.8	4.3
5.6	2.7	6.1	6.1	5.6	3.4	4.5	4.1	2.5	4.3
7.7	3.8	5.9	7.4	6.8	4.5	6.1	4.3	4.3	5.2
7.7	4.5	6.5	7.9	6.5	5.2	6.5	5.2	4.7	5.2
7.9	7.0	7.7	8.1	8.8	8.0	6.8	6.2	6.5	5.9

aufgehoben wird, wenn die Bakterien ihre volle Tätigkeit entfalten. Leider kommt es vor, dass der Kampf zwischen hemmenden und aktivierenden Stoffen zu Gunsten der ersteren ausfällt. Dieser Vorgang wird auch dadurch beeinflusst, dass die verwendete Milch, wie wir später näher besprechen werden, stets selber (thermostabile) hemmende Stoffe in wechselnden Mengen enthält. Einige dieser Stoffe gehen in unser Milchbios über, und, wie wir später sehen werden, wirkt eine zu grosse Menge Bios auf das Wachstum der Milchsäurebakterien ungünstig ein.

Einige charakteristische Beispiele für das soeben besprochene eigentümliche Verhalten sind aus Tabelle I zu ersehen. Wie die verwendeten Zusätze in allen Versuchen aus denselben Portionen herrühren, so ist auch die verwendete Milch überall die gleiche, weil die kohlebehandelte Milch aus der nicht-kohlebehandelten Milch bereitet ist. Ohne Zusatz von Extrakten zeigen die beiden Stämme von *Tbm. lactis* kein stärkeres Wachstum mit Bios + Laktoflavin als mit Bios allein. Ein weiterer Zusatz von Asparagin löst noch nicht die normale Aktivierung aus; dies geschieht erst durch Zusatz von Cystein und noch kräftiger von Cystein + Asparagin, da diese Aminosäuren den Thermobakterien gegenüber eine aktivierende Wirkung besitzen, welche sich zu derjenigen des Laktoflavins addiert.

Was nun die Wirkung der verschiedenen Extrakte betrifft, so führen sie alle zu erhöhter Säurebildung, selbst ohne Zusatz von Laktoflavin und Bios; sie müssen folglich diese beiden Aktivatoren enthalten. In einigen Fällen, besonders gegenüber dem sehr wählerischen *Tbm. lactis* 10, ist die Aktivierung jedoch äusserst gering. Die stärkste aktivierende Wirkung zeigen in den meisten Fällen Luzerneextrakt, Tomatenpüree, Malzkeimextrakt, Leberextrakt und Pankreatin.

Wenn man entscheiden will, ob die Extrakte in erster Linie durch ihren Gehalt an Milchbios oder an Laktoflavin wirken, ist zu untersuchen, ob die Säurebildung durch Zusatz eines oder des anderen dieser Aktivatoren besonders erhöht wird. Da ein Zusatz von Bios zu sämtlichen Extrakten die Aktivierung erhöht, ist anzunehmen, dass keiner von ihnen besonders reich an Bios ist. Meistens enthalten sie dagegen so viel Laktoflavin, dass ein weiterer Zusatz dieses Vitamins die Aktivierung nicht mehr erhöht; dies gilt sowohl mit wie ohne Bioszusatz. *Tbm. helveticum* nimmt jedoch eine Sonderstellung ein, da nur der besonders laktoflavinreiche Leberextrakt und das Pankreatin imstande sind, das grosse Laktoflavinbedürfnis dieses Bakteriums zu befriedigen. Den besten Überblick über den Wert der einzelnen Extrakte sowohl als Biosquelle wie als Laktoflavinquelle gewinnt man, wenn man sie nach den Zahlen 1—11 klassifiziert in der Weise, dass 1 die höchste und 11 die geringste Wirkung angibt¹. Diese Klassifizierung wurde in Tabelle II vorgenommen.

Aus Tabelle II geht hervor, dass den geprüften Bakterien gegenüber Luzerneextrakt als Biosquelle an erster Stelle steht, Tomatenpüree ist Nr. 2 und Malzkeimextrakt Nr. 3. Jedoch wirken Pankreatin gegenüber den stäbchenförmigen Milchsäurebakterien, und Kartoffelextrakt gegenüber *Sc. lactis* und *Sc. cremoris* kräftiger oder

¹ Wenn sich mehrere Extrakte in einer Beziehung gleich verhalten und somit mit derselben Nummer bezeichnet werden müssen, kommen wir selbstverständlich nicht bis auf Nr. 11.

Tabelle II.

Bakterien	Extrakt von										
	Asparagin- mutterlauge	Kartoffeln	Mais	Malzkeimen	Tomaten- püree	Luzerne	Hefe	Kuhkot	Pankreatin	Fleisch	Leber
	Nach Biosgehalt geordnet										
<i>Thermobacterium lactis</i> Nr. 9.....	10	7	11	5	4	1	9	6	3	8	2
— — Nr. 10.....	10	9	8	6	2	3	11	4	1	7	5
— <i>helveticum</i>	8	9	6	3	4	1	11	7	5	10	2
— <i>jugurt</i>	10	9	7	5	4	1	11	6	3	8	2
— <i>bulgaricum</i>	9	7	10	2	4	1	11	3	6	5	8
Relativer Wert für die Thermobakterien.	9	7	8	4	2	1	10	5	2	6	3
<i>Streptobacterium casei</i> Nr. 11.....	10	11	9	8	3	2	4	6	1	5	7
— <i>plantarum</i> Nr. 24.....	6	5	11	1	4	2	8	9	3	10	7
Relativer Wert für die Streptobakterien..	7	7	8	3	2	1	4	6	1	6	5
<i>Streptococcus thermophilus</i> Nr. 7.....	8	6	7	5	2	1	3	9	10	11	4
— <i>lactis</i> Nr. 22.....	5	3	10	8	2	1	4	11	7	6	9
— <i>cremoris</i> Nr. 18.....	5	4	10	2	1	3	9	6	8	11	7
Relativer Wert für die Streptokokken...	5	2	9	3	1	1	4	8	7	9	6
	Nach Laktoflavingehalt geordnet										
<i>Thermobacterium lactis</i> Nr. 9.....	10	4	11	2	5	1	9	6	8	7	3
— — Nr. 10.....	10	7	11	4	3	1	9	6	2	8	5
— <i>helveticum</i>	8	9	11	1	5	6	10	4	2	7	3
— <i>jugurt</i>	9	6	11	2	7	4	10	8	3	5	1
— <i>bulgaricum</i>	7	4	11	3	10	1	9	5	6	2	8
Relativer Wert für die Thermobakterien.	8	7	10	1	5	2	9	6	4	6	3
<i>Streptobacterium casei</i> Nr. 11.....	9	10	11	8	2	5	4	7	3	1	6
— <i>plantarum</i> Nr. 24.....	1	5	11	4	7	2	8	9	3	10	6
Relativer Wert für die Streptobakterien..	4	6	7	6	3	2	6	7	1	5	6
<i>Streptococcus thermophilus</i> Nr. 7.....	8	9	11	2	6	1	4	5	7	3	10
— <i>lactis</i> Nr. 22.....	3	1	11	6	5	2	7	10	4	9	8
— <i>cremoris</i> Nr. 18.....	6	1	11	5	2	3	8	4	9	10	7
Relativer Wert für die Streptokokken....	4	2	9	3	3	1	5	5	6	7	8

mindestens ebenso kräftig wie Malzkeimextrakt. Leberextrakt kommt auch in allererster Linie gegenüber den Thermobakterien mit Ausnahme von *Tbm. bulgaricum*.

Die schlechteste Biosquelle den Thermobakterien gegenüber ist merkwürdigerweise Hefewasser; dies beweist, dass das, was wir Milchbios genannt haben, aus

anderen Bestandteilen als Hefebios bestehen muss. Sonst ist Maisextrakt die schlechteste Biosquelle; jedoch ist in vielen Fällen Fleischextrakt ebenso schlecht.

Betrachten wir nun dieselben Extrakte als Laktoflavinquellen, so ist die Reihenfolge eine etwas andere. Luzerneextrakt steht auch hier meist an erster Stelle. Tomatenpüree kann dagegen kaum den zweiten Platz behaupten, weil es dem *Tbm. bulgaricum*, dem *Tbm. jugurt*, dem *Sbm. plantarum* und auch einigen der Streptokokken nicht gefällt. Malzkeimextrakt bleibt als Nr. 3. Er gefällt jedoch dem *Sbm. casei* ebenso wenig als Laktoflavinquelle wie als Biosquelle. Kartoffelextrakt ist für *Sc. lactis* und *Sc. cremoris* eine noch bessere Laktoflavin- als Biosquelle. Leberextrakt verhält sich den einzelnen Bakterien gegenüber ganz gleich als Laktoflavin- wie als Biosquelle. Maisextrakt ist als Laktoflavinquelle so schlecht, dass man daraus schließen kann, dass er nur eine Spur dieses Vitamins enthält. Das Interessanteste an diesen Untersuchungen ist, dass sich so zu sagen jede Bakterienart den Aktivatoren gegenüber verschieden verhält. Das beste Beispiel bilden zwei so verwandte Arten wie *Sbm. casei* und *Sbm. plantarum*, denen gegenüber sich Asparaginmutterlauge und Fleischextrakt umgekehrt verhalten: in einem Fall sind sie eine sehr schlechte und im anderen Fall die allerbeste Laktoflavinquelle.

Die Erklärung für diese merkwürdige Erscheinung kann nur die sein, dass die Extrakte ausser Bios und Laktoflavin noch Hemmstoffe oder andere für die einzelnen Bakterienarten ganz spezifische Aktivatoren enthalten, welche die Wirkung der untersuchten Aktivatoren hemmen oder fördern können. Es ist somit ganz natürlich, dass in einem Pflanzenextrakt wie Asparaginmutterlauge Stoffe vorhanden sind, die das Wachstum eines Pflanzenbewohners wie *Sbm. plantarum* begünstigen, und es ist ebenso natürlich, dass im Fleischextrakt Stoffe vorkommen, die für einen Milchbewohner wie *Sbm. casei* besonders gut sind.

Wie bereits erwähnt, haben SADLER, EAGLES, BOWEN und WOOD auf eine ganz ähnliche Erscheinung aufmerksam gemacht, nämlich darauf, dass die Betakokken, welche Pflanzenbewohner sind, von Luzerneextrakt weit kräftiger aktiviert werden als von Hefautolysat, während dies mit den Streptokokken nicht der Fall ist. Wir haben diese interessante Erscheinung bestätigen können. Die hier konstatierte Unsicherheit der Vitaminbestimmungen mittels Mikroorganismen ist in den umständlichen Tierversuchen keineswegs geringer, da bekanntlich die verschiedenen Tiere, und sogar so nahe verwandte Tiere wie Ratte und Meerschweinchen, sich den verschiedenen Vitaminen gegenüber ganz verschieden verhalten. Quantitative Vitaminbestimmungen lassen sich deshalb nur mit rein chemischen Methoden erreichen. Leider sind die meisten der bisherigen chemischen Methoden nicht genügend spezifisch.

Dass die geprüften Extrakte auch andere Aktivatoren als Milchbios und Laktoflavin enthalten, geht am deutlichsten daraus hervor, dass sie auch auf normale Milch eine aktivierende Wirkung ausüben, obwohl solcher Milch nicht mittels Kohle Bios und Laktoflavin entzogen worden sind.

Aus Tabelle I ist zu schliessen, dass diese anderen Aktivatoren in vielen Fällen Aminosäuren sind. Besonders gegenüber den Thermobakterien wird die Milch durch

die Mischung von Cystein und Asparagin stark aktiviert. Speziell für die aktivierende Wirkung der Asparaginmutterlauge ist ihr Gehalt an diesen Aminosäuren nicht ohne Bedeutung. Die Streptokokken vertragen zwar das Cystein nicht, gegenüber diesen Bakterien übt aber Asparagin allein eine günstige Wirkung aus.

Die Aminosäuren können jedoch Bios oder Laktoflavin nicht ersetzen, sondern nur ihre Wirkung erhöhen. Wir haben die wichtigsten Aminosäuren in vielen verschiedenen Kombinationen als Zusatz zur kohlebehandelten Milch untersucht. Von den einzelnen Aminosäuren wurden je nach ihrem höheren oder niedrigeren N-Gehalt 0.3—1 ‰ verwendet. Cystein + Asparagin ist, wie soeben erwähnt, eine günstige Mischung den stäbchenförmigen Milchsäurebakterien gegenüber; eine noch stärker aktivierende Wirkung übt jedoch meistens Cystein + Asparagin + Lysin aus. Asparagin lässt sich in vielen Fällen durch zitronensaures Ammoniak ersetzen. Die aktivierende Wirkung lässt sich nicht durch einen weiteren Zusatz von Arginin, Glutaminsäure oder Histidin verbessern. Tryptophan ist diesmal nicht geprüft worden, weil wir früher gezeigt haben, dass diese für die Tiere so wichtige Aminosäure für die Milchsäurebakterien keinen Wert hat.

Wir haben auch die Wirkung eines Zusatzes von Aminosäuren zu der in unserem Laboratorium viel verwendeten Kaseinbouillon¹ untersucht und gefunden, dass besonders die schwefelhaltigen Aminosäuren das Wachstum und die Säuerung sowohl von stäbchenförmigen Milchsäurebakterien wie von Betakokken beschleunigen. Während *Tbm. bulgaricum* nicht viel Cystein verträgt, kann das andere Yoghurtbakterium, *Tbm. jugurt*, fast nicht genug Cystein oder Glutathion bekommen. Da das verwendete Cysteinchlorhydrat doppelt so viel Schwefel enthält wie Glutathion, entspricht, wie aus Tabelle III hervorgeht, die Wirkung dieser Aminosäuren ungefähr ihrem Schwefelgehalt. Wenn man der Kaseinbouillon eine genügende Menge dieser Aminosäuren zusetzt, wird sie zu einem fast ebenso guten Nährboden für *Tbm. jugurt*

Tabelle III.

Nährsubstrat	<i>Thermobacterium jugurt</i> nach Tagen	
	2	7
Kaseinbouillon ohne Zusatz	0.7	3.4
— mit 1 ‰ Cystein	3.4	7.7
— - 2 - —	3.8	7.7
— - 4 - —	7.0	9.0
— - 2 - Glutathion	4.3	6.3
— - 4 - —	5.0	9.2
— - 6 - —	5.6	9.9
— - 8 - —	6.8	9.0
Hefeautolysat ohne Zusatz	7.7	10.4

¹ Pepsinverdautes Kasein mit 0,5 ‰ N und mit Zusatz von Nährsalzen und Zucker (wo nichts anderes steht 2 ‰ Traubenzucker).

wie Hefeautolysat desselben Stickstoffgehalts (0.5 ‰). Daraus ist zu schliessen, dass die aktivierende Wirkung des Hefeautolysats vielen Milchsäurebakterien gegenüber zum Teil seinem Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren zuzuschreiben ist.

Unter den obenerwähnten Extrakten wurde auch Hefewasser geprüft. Die aktivierende Wirkung desselben ist jedoch nicht so gut wie die des hier im Laboratorium sonst immer verwendeten Hefeautolysats. Da letzteres ausser den in den Hefezellen vorhandenen Aktivatoren auch Aminosäuren in grösseren Mengen als das Hefewasser enthält, haben wir Hefeautolysat mit Hefewasser desselben Stickstoffgehalts (1 ‰) verglichen. In einem Fall (a, Tabelle IV) wurde die Erhöhung des Stickstoffgehalts durch Einengung vorgenommen, in einem anderen Fall (b) dagegen durch Zusatz der günstigen Aminosäuremischung Cystein + Asparagin + Lysin. Von sämtlichen Hefepräparaten wurden der Milch 2 ‰ zugesetzt.

Tabelle IV.

Zusatz	Milch	Weitere Zusätze	<i>Tbm.</i> <i>lactis</i> 9	<i>Tbm.</i> <i>jugurt</i>	<i>Tbm.</i> <i>bulgaricum</i>	<i>Sbm.</i> <i>casei</i> 11	<i>Sbm.</i> <i>plantarum</i> 24	<i>Bc.</i> <i>cremoris</i> 7
Kein Zusatz	Kohlebehandelt	Kein	0.2	0.5	0.2	0.8	5.0	1.4
		Laktoflavin+Bios	11.9	19.6	5.4	6.3	8.7	2.3
	Normal	Kein	12.5	23.6	10.8	5.0	3.6	1.4
Hefeautolysat	Kohlebehandelt	Kein	6.1	3.8	2.3	7.7	12.6	11.5
		Laktoflavin+Bios	20.9	14.4	11.3	14.9	17.5	13.3
	Normal	Kein	19.6	28.3	13.5	11.7	7.2	6.5
a Hefewasser ein- geengt	Kohlebehandelt	Kein	6.5	3.8	2.5	7.7	11.9	6.5
		Laktoflavin+Bios	16.9	14.4	12.8	15.7	14.4	7.9
	Normal	Kein	16.2	28.3	12.8	12.4	9.0	5.4
b Hefewasser mit Aminosäuren	Kohlebehandelt	Kein	2.0	2.3	0.7	7.4	9.0	2.5
		Laktoflavin+Bios	18.9	17.1	17.6	14.4	9.7	6.8
	Normal	Kein	16.9	27.0	12.6	10.8	6.8	4.3

Bezüglich der Behandlung des Hefewassers scheint das Einengen am günstigsten für die Streptobakterien und Betakokken zu sein, wogegen ein Zusatz der genannten Aminosäuren (in Übereinstimmung mit den Befunden in Tabelle I) günstiger für die Thermobakterien ist. Da das Hefeautolysat reich an Hefenucleinsäure ist, haben wir auch versucht diesen Stoff dem Hefewasser zuzusetzen, ohne jedoch eine günstige Wirkung damit zu erzielen.

Mit Rücksicht darauf, dass bisher niemand Rübenextrakt als Aktivator für die Milchsäurebakterien vorgeschlagen hat, haben wir ihn in den bereits besprochenen Versuchen ausser Acht gelassen. Da Rüben aber oft als frisches oder ensiliertes Futter verwendet werden, und da sich bei der Ensilierung besonders Streptobakterien und Betakokken in den Rüben entwickeln, haben wir die Wirkung von Runkelrüben-

extrakt mit der des Kartoffelextrakts gegenüber den genannten Milchsäurebakterien verglichen. Da Runkelrübenextrakt reich an Rohrzucker ist, wurde dem Kartoffel- extrakt eine entsprechende Menge Rohrzucker zugesetzt. In dieser Versuchsreihe verwendeten wir nicht die kohlebehandelte Milch als Nährsubstrat, sondern Witte- peptonbouillon, in welcher Streptobakterien und Betakokken nicht besonders gut gedeihen. Wie Tabelle V zeigt, wird dieses Substrat gegenüber den geprüften Bak-

Tabelle V.

Bakterienstamm	Wittepepton- bouillon		
	Ohne Zusatz	Mit Kartoffel- extrakt	Mit Rüben- extrakt
<i>Belacoccus cremoris</i> 7.....	0.9	3.6	1.8
— — 9.....	0.5	3.4	3.4
— — 10.....	1.7	4.7	3.4
— <i>bovis</i> 31.....	0.6	2.9	5.0
— — 43.....	1.1	7.0	7.0
— <i>arabinosaceus</i> 4....	1.6	2.7	3.2
— — 5....	2.5	6.3	5.0
— — 8....	3.2	5.6	5.4
— — 15....	1.9	5.4	4.3
<i>Streptobacterium plantarum</i> 9...	0.5	6.5	6.8
— — 15...	0.5	6.3	6.1
— — 20...	1.8	5.6	5.4
— (acetylcholini) 1.0	6.1	5.6	
— — 23...	1.4	5.2	5.2
— — 24...	1.1	6.5	6.1
— — 39...	1.1	6.5	7.0
— — 43...	1.1	7.0	7.0
— <i>casei</i> 6.....	1.6	4.3	4.3
— — 11.....	2.0	4.7	5.9
— — 13.....	2.3	4.5	4.7
— — 19.....	3.6	6.5	7.0
— — 24.....	3.2	5.9	6.5

Tabelle VI.

Milch	Zusatz	<i>Tbm.</i> <i>helveticum</i>	<i>Sbm.</i> <i>casei</i> 11
Nor- mal	Ohne Zusatz.....	0	0.5
	Mit Bios 1.....	1.6	3.6
	- — 3.....	1.1	2.5
	- Laktoflavin.....	0.5	0.9
	- Laktoflavin+Bios 1	2.3	5.2
	- — + - 3	9.0	6.1
	Ohne Zusatz.....	18.2	7.7

terien durch die gleiche N-Menge (0.02%) der beiden Extrakte fast gleich stark aktiviert. Zwei der Butteraromabakterien (*Bc. cremoris*) zogen Kartoffelextrakt vor. Den grössten Unterschied zeigt *Bc. bovis* 31, welcher den Rübenextrakt dem Kartoffelextrakt vorzieht.

Wie aus Tabelle I hervorgeht, bildet *Sbm. plantarum* in normaler Milch weniger Säure als in kohlebehandelter Milch mit Laktoflavin + Bios, ja bisweilen nicht viel mehr als in kohlebehandelter Milch ohne Zusatz. Diese merkwürdige Erscheinung ändert sich durch Zusatz von Aminosäuren gar nicht und durch Zusatz der ge-

prüften Extrakte (mit Ausnahme von Asparaginmutterlauge) nur wenig. Dieses Verhalten lässt sich nicht dadurch erklären, dass wir der kohlebehandelten Milch vielleicht etwas mehr Laktoflavin + Bios zugesetzt haben als in der normalen Milch vorhanden ist, denn die meisten anderen Milchsäurebakterien verhalten sich umgekehrt und sind nur ausnahmsweise imstande ebensoviel Säure in der mit den natürlichen Aktivatoren versetzten kohlebehandelten Milch zu bilden, wie in der normalen Milch. Es bleibt deshalb nur die Erklärung übrig, dass Milch ausser aktivierenden Sub-

stanzen auch — thermostabile¹ — Substanzen enthält, die auf das Wachstum einzelner Milchsäurebakterien hemmend wirken, und dass diese Substanzen von der aktiven Kohle adsorbiert werden, nicht aber wie die B-Vitamine in das Eluat übergehen.

Der Grund, weshalb die thermostabilen Hemmstoffe der Milch nicht in das Eluat übergehen, ist der, dass sie (wie auch der grösste Teil des Laktoflavins) beim angewandten p_H durch das übliche dreimalige Auswaschen der Kohle vor dem Eluieren mit ausgewaschen werden. Um diese Annahme zu beweisen gingen wir folgendermassen vor: wir teilten eine zur Adsorption verwendete Kohleportion in zwei Teile; ein Teil wurde nur einmal, der zweite dagegen, wie gewöhnlich, dreimal mit Wasser gewaschen, und wir gewannen aus dieser Kohle Bios 1 beziehungsweise Bios 3. Aus Tabelle VI ersieht man, dass Bios 1 sowohl an Laktoflavin wie an Hemmstoffen reicher ist als Bios 3, weil es gegenüber den geprüften Milchsäurebakterien ohne Laktoflavin besser, mit Laktoflavin aber schlechter als Bios 3 aktiviert.

Die hier erwähnten Hemmstoffe wirken auf alle Milchsäurebakterien, die in sterilisierter Milch langsam wachsen, oder richtiger gesagt, sie bewirken, dass solche Bakterien Mühe haben sich in der Milch zu entwickeln. Sie sind jedoch nicht in allen Milchproben gleich stark vertreten. Wir haben Proben mit so viel Hemmstoffen gehabt, dass ihre Wirkung auf *Streptobacterium casei* und auf Betakokken ebenso stark war wie auf *Streptobacterium plantarum*. Die mehr oder weniger grosse Empfindlichkeit einiger Bakterien gegenüber den thermoresistenten Hemmstoffen der Milch lässt sich somit nicht als Artmerkmal aufstellen.

In aseptisch gewonnener Milch, welche keine Spur der in Kuhkot vorkommenden Aktivatoren besitzt, kommt die hemmende Wirkung stärker zum Vorschein.

Tabelle VII.

Bakterien	Milch	Zusatz	Ohne Extrakt	Mit Extrakt von		
				Mais	Luzerne	Leber
<i>Thermobacterium lactis</i> Nr. 9 nach 48 Stunden bei 37° C.	Kohle- behandelt	Ohne Zusatz	0.2	1.6	16.2	11.7
		Mit Bios	2.3	3.5	16.9	18.4
		Mit Bios+Laktoflavin . .	6.9	11.0	17.2	18.0
	Normal	Ohne Zusatz	2.5	7.3	18.9	18.8

Aus Tabelle VII ersieht man, dass *Thermobacterium lactis* Nr. 9 in einer aseptisch gewonnenen Milchprobe nur 2.5 ‰ Säure zu bilden vermag (während es sonst 12—14 ‰ bildet). Bei dem schwach aktivierenden Maisextrakt ist die hemmende Wirkung noch zu spüren, und es wird in der kohlebehandelten Milch mit Laktoflavin und Bios mehr Säure gebildet als in der nicht kohlebehandelten Milch. Erst mit den

¹ Die bekannten thermolabilen bakteriziden Substanzen interessieren uns in diesem Zusammenhang nicht, weil wir lediglich mit sterilisierten Flüssigkeiten arbeiten.

kräftig aktivierenden Extrakten von Luzerne oder Leber ist die Hemmung überwunden.

Eine andere Art thermoresistenter Hemmstoffe der Milch lässt sich nicht aus dem Kohleeluat auswaschen, sondern wird eben darin angereichert. In der folgenden Tabelle sieht man ein Beispiel eines ungemein bakterizid wirkenden Biospräparates. Bezeichnen wir die der Milch entsprechende Biosmenge mit B, so ist $\frac{1}{2}$ B und 2 B die Hälfte beziehungsweise das Doppelte dieser Menge.

Tabelle VIII.

Milch	Zusatz	<i>Tbm.</i> <i>jugurt</i>	<i>Tbm.</i> <i>helveticum</i>
Kohle- behandelt	Ohne Zusatz	0.7	0
	Mit Laktoflavin + $\frac{1}{2}$ B	17.1	11.1
	- — + B	20.7	13.1
	- — + 2 B	15.1	3.0
Normal	Ohne Zusatz	23.9	20.8
	Mit 2 B	14.4	0.7

Aus Tabelle VIII ersieht man, dass es schädlich sein kann, der kohlebehandelten Milch zu viel Bios zuzusetzen. Noch deutlicher kommt dies zum Vorschein, wenn man der nicht kohlebehandelten und somit bereits Hemmstoffe enthaltenden Milch Bios zusetzt. Man sieht, dass *Tbm. helveticum* den Hemmstoffen gegenüber viel empfindlicher ist als *Tbm. jugurt*. Wir haben nicht entscheiden können, ob diese ziemlich thermostabilen Hemmstoffe daran schuld sind, dass, wie früher gezeigt¹, die Thermobakterien erst dann in der Milch ihre volle Tätigkeit entfalten können, wenn sie hochsterilisiert worden ist. Es liegen nämlich folgende beiden Möglichkeiten vor: entweder kann durch die Sterilisation eine Reduktion (durch den Milchzucker verursacht) und damit eine Unschädlichmachung der Hemmstoffe stattfinden, oder es werden bei diesem Prozess Aktivatoren gebildet.

Wie bereits früher gezeigt, spielen sich im Hefeautolysat ganz ähnliche Prozesse ab². Kehren wir zu Tabelle IV zurück, so sehen wir eine deutliche Wirkung der zuerst besprochenen hemmenden Stoffe der Milch nicht nur gegenüber dem Butterarombakterium *Betacoccus cremoris* und dem *Streptobacterium plantarum* sondern auch gegenüber dem *Streptobacterium casei*, d. h. eine stärkere Säurebildung

¹ ORLA-JENSEN und JOHANNE JACOBSEN. Neue Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milch. Zentralblatt für Bakteriologie II. Abt. 1930. Bd. 80, S. 321—341.

ORLA-JENSEN. Über den Einfluss der Pasteurisierung der Käsereimilch auf die Käsereifung. Bericht des XI. milchwirtschaftlichen Weltkongresses. Berlin 1937.

² ORLA-JENSEN. Die Abhängigkeit der Milchsäuregärung von der Art und Weise, in welcher die Sterilisierung der Nährböden ausgeführt wird. Bericht des IX. milchwirtschaftlichen Weltkongresses. Kopenhagen 1931.

in der kohlebehandelten Milch mit Bios + Laktoflavin als in der nicht kohlebehandelten Milch. Diese Erscheinung wird durch die kräftigen Aktivierungsmittel Hefewasser und Hefeautolysat eher gefördert als aufgehoben, ja durch Zusatz von Hefewasser mit Aminosäure kommt sie sogar bei *Thermobacterium lactis* und *Thermobacterium bulgaricum* zum Vorschein, wo sie sonst nicht zu beobachten ist. Die hemmenden Stoffe der Hefeextrakte wirken offenbar in derselben Richtung wie diejenigen der Milch, wodurch ihre Wirkung verstärkt wird. Hefe enthält eben neben den für viele Milchsäurebakterien stark aktivierenden Stoffen auch sehr stark hemmende Stoffe, und die pathogenen Streptokokken können überhaupt nicht im Hefeautolysat mit 1 % Stickstoff wachsen. Dies erklärt höchst wahrscheinlich die günstige Wirkung, welche Hefe gegenüber Beulen und anderen von Streptokokken hervorgerufenen Entzündungen ausübt.

Zum Schluss wollen wir noch den Befund von SNELL und STRONG besprechen, wonach gewisse Milchsäurebakterien Laktoflavin entbehren können¹. Betrachten wir die in Tabelle I geprüften Milchsäurebakterien, so müssen wir zugeben, dass gegenüber *Sbm. plantarum* (wozu die von SNELL und STRONG geprüften *Lactobacillus arabinosus* und *Lactobacillus pentosus* gehören) eine günstige Wirkung von Laktoflavin nur in Verbindung mit Tomatenpuree oder Kuhkot zu spüren ist.

Es ist dagegen unrichtig, dass *Sc. lactis* in seiner Entwicklung von Laktoflavin nicht begünstigt wird. In unserer ersten Arbeit haben wir ausdrücklich hervorgehoben, dass die Streptokokken oft nicht mehr Laktoflavin brauchen als bereits in unserem Milchbios vorhanden ist. Der in Tabelle I geprüfte Stamm von *Sc. lactis* (Nr. 22) reagiert indessen deutlich auf Laktoflavin, indem in den 4 ersten Spalten der Tabelle die Zahlen mit Laktoflavin + Bios grösser sind als mit Bios allein. Die gleiche Erscheinung wiederholt sich, wenn laktoflavinarme Extrakte, wie die von Mais und Kuhkot, zugesetzt werden.

SNELL und STRONG haben zu ihren Versuchen eine Peptonbouillon verwendet, in welcher das Laktoflavin durch Alkalibehandlung zerstört werden soll. Zur Entfernung des Laktoflavins ist, jedenfalls was die Milch betrifft, die Alkalibehandlung nicht so geeignet wie das von uns benutzte Adsorptionsverfahren. Da Wittepepton mit Glukose und nur 0,2 % N indessen ein schlechtes Nährsubstrat für die Milch-

Tabelle IX.

Wittepeptonbouillon	<i>Sc. lactis</i> 241	<i>Sc. cremoris</i> 37
Ohne Zusatz	2.7	1.4
Mit Laktoflavin	2.7	2.0
- Bios	5.6	3.2
- Laktoflavin+Bios	6.3	5.0

¹ The Journal of Biological Chemistry 1938, Bd. 1938, S. cxii.

säurebakterien ist, kann man dasselbe ganz gut — auch ohne vorhergehende Alkalibehandlung — zur Prüfung verschiedener Aktivatoren verwenden. Die Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Diese Tabelle zeigt, dass die beiden geprüften Streptokokken mit Laktoflavin einen merkbaren Ausschlag geben, wenn der Bouillon Bios zugesetzt worden ist, obwohl das verwendete Wittepepton wie auch unser Milchbios bereits Laktoflavin enthalten. Der Bedarf dieser beiden Streptokokken an Laktoflavin kann deshalb nicht ganz gering sein.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die aktivierende Wirkung, welche verschiedene pflanzliche und tierische Extrakte auf das Wachstum der Milchsäurebakterien ausüben, in höherem Masse von ihrem Laktoflavin- als von ihrem Biosgehalt herrührt. Luzerneextrakt aktiviert am stärksten, jedoch wirken Tomatenpuree, Malzkeimextrakt, Leberextrakt und Pankreatin gegenüber vielen Milchsäurebakterien sowie Kartoffelextrakt besonders gegenüber *Sc. lactis* und *Sc. cremoris* fast ebenso gut. Runkelrübenextrakt ist meistens dem Kartoffelextrakt gleichwertig. Gegenüber *Sbm. plantarum* und *Bc. cremoris* wirkt Hefeautolysat besser als Hefewasser des gleichen Stickstoffgehalts.

Die aktivierende Wirkung von Laktoflavin und Bios wird durch gewisse in den Extrakten vorkommende Aminosäuren erhöht. Dies macht sich besonders den Thermobakterien gegenüber geltend, und für die Milch scheint die günstigste Aminosäuremischung Cystein + Asparagin + Lysin zu sein.

Für *Thermobacterium jugurt* wird Kaseinpeptonbouillon zu einem ebenso guten Nährsubstrat wie Hefeautolysat, wenn man ihr eine genügende Menge schwefelhaltiger Aminosäuren (Cystein oder Glutathion) zusetzt.

Neben den bekannten thermolabilen bakteriziden Stoffen enthält Milch wenigstens zwei thermostabile Stoffe, die hemmend auf die Entwicklung der Milchsäurebakterien wirken. Ähnliche Stoffe kommen im Hefeextrakt und wahrscheinlich auch in den anderen von uns geprüften aktivierenden Extrakten vor, so dass wir in unseren Versuchen stets mit einem Zusammenspiel der Aktivatoren und Hemmstoffe zu tun hatten; es hängt daher von zufälligen Umständen ab, welche dieser Faktoren ausschlaggebend werden.

Das höchst verschiedene Bedürfnis nach bestimmten Wuchsstoffen und die verschiedene Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Hemmstoffen, welche die einzelnen Arten von Milchsäurebakterien aufweisen, ist eine wesentliche Ursache dafür, dass bei der spontanen Säuerung verschiedener Stoffe bald die eine und bald die andere Art von Milchsäurebakterien die Oberhand gewinnt.

... die ...

Zusammenfassung

... die ...

... die ...

WORAUS BESTEHT DAS MILCHBIOT?

Von den beiden wichtigen Wuchsstoffen der Milchsäurebakterien, Laktoflavin und Milchbios, ist nur der erstere ein bekannter Stoff, während der letztere ein Gemisch unbekannter Bestandteile ist, die nur dies gemein haben, dass sie an Norritkohle adsorbierbar sind und sich davon mit Pyridin und Methylalkohol eluieren lassen. Wenn man einer wässrigen Milchbiolösung so viel absoluten Alkohol zusetzt, dass der Alkoholgehalt auf 80 % ansteigt, so scheiden sich grosse prismatische Kristalle aus, die weder allein noch in Verbindung mit dem Filtrat aktivierende Eigenschaften besitzen.

Wie in der vorigen Arbeit gezeigt, kommen milchbiosähnliche Substanzen in vielen pflanzlichen und tierischen Extrakten vor, und SNELL, STRONG und PETERSON¹ haben eine solche Substanz aus Leber gewonnen. Sie ist mit Bleiacetat nicht fällbar, in 92 %-igem Alkohol löslich und lässt sich aus der sauren wässrigen Lösung mit Äther extrahieren. Möglicherweise ist sie mit WILLIAMS Pantothersäure identisch. Wir haben versucht, diese Substanz in ähnlicher Weise aus Milchbios herzustellen.

Mit einem maximalen Verlust von 50—75 % bei der Herstellung der hypothetischen Pantothersäure rechnend, haben wir der kohlebehandelten Milch von dieser Substanz 2—4 mal soviel zugesetzt wie der Biosmenge entspricht, die wir als Kontrolle verwenden. Diese Mengen sind in der folgenden Tabelle mit 2 P und 4 P

Tabelle I.

Milch	Zusätze	<i>Tbm.</i> <i>lactis</i> 9	<i>Tbm.</i> <i>helveti-</i> <i>cum</i>	<i>Tbm.</i> <i>jugurt</i>	<i>Tbm.</i> <i>bulgari-</i> <i>cum</i>	<i>Sbm.</i> <i>plan-</i> <i>tarum</i> 24	<i>Sc.</i> <i>thermo-</i> <i>philus</i> 7	<i>Sc.</i> <i>cremoris</i> 18	<i>Sc.</i> <i>lactis</i> 22
Kohlebehandelt Nor- mal	Ohne Zusatz.....	14.4	19.2	23.2	14.9	1.3	7.7	3.6	6.2
	Mit Laktoflavin+Bios..	8.3	9.7	19.5	9.3	3.6	7.4	4.0	6.8
	- — +4 P...	1.5	4.3	7.7	—	2.2	1.8	3.4	2.9
	- — +2 P...	1.3	3.8	5.6	4.3	2.0	1.8	1.8	2.5
	- — ohne P.	0.9	1.8	0.7	1.6	1.6	1.1	0.6	1.3
	Ohne Laktoflavin+2 P.	0.9	1.4	—	2.9	2.0	1.6	—	—
	Mit Laktoflavin+Ni+Nu	0.9	2.5	4.1	1.6	1.6	1.6	1.8	5.2
	Titriert nach Tagen...	2	2	2	2	4	2	5	3

¹ Growth Factors for Bacteria, The Biochemical Journal 1937 XXXI, S. 1789—1799.

bezeichnet. Wie in der vorigen Arbeit geben die Zahlen an, wie viel Säure, in ‰ ausgedrückt, die geprüften Bakterien bei der Optimaltemperatur gebildet haben.

Aus Tabelle I geht hervor, dass die kohlebehandelte Milch von P mehr oder weniger aktiviert wird. In einigen Fällen findet jedoch fast gar keine Aktivierung statt, weshalb man annehmen muss, dass die Hauptmenge der aktivierenden Biosbestandteile etwas anderes sein muss als Pantothensäure.

Da wir in früheren Arbeiten oft eine schwache wachstumsfördernde Wirkung von Hefenucleinsäure (Nu) auf die Milchsäurebakterien bemerkt haben, prüften wir im obigen Versuch auch diese Substanz in Verbindung mit dem nach den Untersuchungen von KNIGHT¹ als Aktivator für gewisse Mikrokokken dienenden Nikotinsäureamid (Ni). Von jeder dieser Substanzen verwendeten wir 1 ‰. Aus Tabelle I ersieht man, dass die genannte Mischung eine ähnliche aktivierende Wirkung wie 2 P ausübt, meist jedoch eine etwas geringere, gegenüber *Sc. lactis* 22 aber eine viel grössere.

Von E. F. MØLLER ist behauptet worden², dass Vitamin B₆, das Adermin, ein Wuchsstoff der Milchsäurebakterien sei. Dieses Vitamin wurde kürzlich rein dargestellt, von R. KUHN aus Hefe und von E. MERCK aus Reiskleie. KUHN und WENDT haben dem reinen Aderminchlorhydrat die Formel C₈H₁₂O₃NCl gegeben³. Dank des grossen Entgegenkommens von Prof. KUHN und der Firma MERCK ist es uns möglich gewesen nachzuprüfen, ob die reinen Präparate von Aderminchlorhydrat unser Milchsäurebios ersetzen können. Wir haben dies geprüft sowohl mit als auch ohne ätherlösliche Biosbestandteile (2 P) in der Menge von 0,75 mg/l, was nach E. F. MØLLER sehr reichlich sein sollte. Gleichzeitig haben wir die aktivierende Wirkung von Nikotinsäureamid (Ni) und Hefenucleinsäure (Nu) untersucht.

Aus Tabelle II geht hervor, dass Vitamin B₆ keine nennenswerte aktivierende Wirkung gegenüber den geprüften Milchsäurebakterien ausübt. Ohne einen weiteren Zusatz von ätherlöslichen Biosbestandteilen ist jedenfalls gar keine Wirkung zu spüren, und mit diesen Bestandteilen ist die Wirkung nicht wesentlich grösser als mit 2 P oder eventuell 4 P allein (vergl. Tabelle I). Vorsichtshalber haben wir 2 P mit und ohne B₆ in derselben kohlebehandelten Milch mit Laktoflavinzusatz geprüft, und wir bekamen ganz dieselben Zahlen mit und ohne B₆.

In früheren Arbeiten haben wir gezeigt, dass Vitamin B₁ ohne Bedeutung für die Milchsäurebakterien ist, und nach den hier vorliegenden Untersuchungen scheint das nämliche für Vitamin B₆ zu gelten. Von den bisher geprüften B-Vitaminen ist somit nur Vitamin B₂, das Lakto- oder besser das Riboflavin, notwendig für die Entwicklung der Milchsäurebakterien. Dagegen scheinen nach den Tabellen I und II Nikotinsäureamid und Hefenucleinsäure eine wachstumsfördernde Wirkung auf

¹ The nutrition of *Staphylococcus aureus*. Biochemical Journal 1937. Bd. 31, S. 731—737.

² Vitamin B₆ (Adermin) als Wuchsstoff für Milchsäurebakterien. H. S.s Zeitschrift für physiologische Chemie 1938, Bd. 254, S. 285—286.

³ Berichte der Chemischen Gesellschaft 1938. Bd. 71. S. 780, 1118, 1534. Nach Science 1939, Vol. 89, No. 2311 ist es HARRIS und FOLKERS gelungen, B₆ synthetisch darzustellen. Es ist ein Pyridinderivat.

Tabelle II.

Milch	Zusätze	<i>Tbm. lactis</i> 9	<i>Tbm. lactis</i> 10	<i>Tbm. helveticum</i>	<i>Tbm. jugurt</i>	<i>Tbm. bulgaricum</i>	<i>Sbm. casei</i> 11	<i>Sbm. plantarum</i> 24	<i>Sc. thermophilus</i> 7	<i>Sc. cremoris</i> 18	<i>Sc. lactis</i> 22		
Normal	Ohne Zusatz	16.4	12.4	20.3	25.7	16.7	6.8	1.4	8.8	6.2	6.3		
Kohlebehandelt mit Laktosflavin	Ohne Vitamin B ₆ Mit Bios	Ohne Ni oder Nu	13.9	11.5	16.9	23.4	14.4	5.2	3.6	8.1	4.5	6.1	
		Mit Ni	14.0	11.9	17.6	24.1	14.3	5.9	3.6	8.3	4.6	6.1	
		- Nu	16.9	11.3	17.3	20.5	14.3	6.5	5.3	8.0	4.5	6.1	
		- Ni+Nu	17.1	11.6	18.7	23.4	14.9	6.5	5.3	8.1	4.7	6.3	
	Mit Vitamin B ₆ , ohne Bios	Mit 2 P	Ohne Ni oder Nu	2.3	1.4	7.7	6.1	3.0	1.8	2.0	1.6	2.7	5.0
			Mit Ni	3.2	1.4	7.7	10.8	2.9	1.8	2.0	1.7	2.5	5.2
		Ohne P	- Nu	1.6	0.7	3.1	10.8	2.5	2.3	2.7	4.2	2.5	5.0
			- Ni+Nu	2.3	0.9	3.6	10.6	2.9	2.5	3.2	4.8	3.6	5.5
	Ohne P	Ohne Ni oder Nu	1.4	0.9	2.0	3.2	2.3	1.4	1.4	0.9	0.5	1.8	
		Mit Ni	1.4	0.9	1.8	3.6	2.3	1.4	1.1	0.9	0.7	2.9	
		- Nu	0.7	0.5	1.8	1.8	2.0	2.5	1.6	2.9	1.5	3.2	
		- Ni+Nu	0.9	0.5	1.8	2.5	2.0	2.7	2.0	4.1	3.2	5.2	
		Ohne Zusatz	0.9	0.7	2.0	3.1	2.3	1.1	1.1	0.9	0.5	1.8	
	Titriert nach Tagen		2	2	2	2	2	4	4	2	5	3	

die Milchsäurestreptokokken auszuüben. Gegenüber den stäbchenförmigen Milchsäurebakterien ist diese Wirkung knapp so ausgesprochen, bisweilen sogar schädlich. Wenn Bios vorhanden ist, lässt sich die Wirkung nur gegenüber dem *Tbm. lactis* 9 und dem *Sbm. plantarum* deutlich nachweisen; es ist daher anzunehmen, dass diese Bestandteile meistens in genügender Menge im Bios vorkommen. Wenn dagegen kein Bios sondern nur die ätherlösliche Pantothenensäure zugegen ist, spürt man die Wirkung sowohl gegenüber dem *Tbm. jugurt* wie gegenüber den Streptokokken. Bei den letzteren tritt diese Wirkung am deutlichsten in Erscheinung, wenn gar keine Biosbestandteile, also auch keine Pantothenensäure, vorhanden sind, und man sieht dann, dass die Nucleinsäure etwas stärker als das Nikotinsäureamid wirkt, dass man aber die stärkste Aktivierung mit diesen beiden Substanzen zusammen bekommt. Gegenüber *Sc. lactis* 22 aktiviert diese Mischung die kohlebehandelte Milch fast ebenso kräftig wie das Bios. Es lag daher nahe, die aktivierende Wirkung dieser Mischung gegenüber einer grösseren Anzahl Streptokokken verschiedenen Ursprungs zu prüfen¹.

¹ Es soll beispielsweise erwähnt werden, dass *Sc. lactis* 23 aus isländischem Roquefortkäse und *Sc. cremoris* 193 (identisch mit SUDLERS & EAGLES E. M. B. 193) aus kanadischem Kingstonskäse isoliert worden sind. *Sc. liquefaciens* 1 (identisch mit FREUDENREICH'S *Micrococcus casei amari*) ist jetzt im Laboratorium seit über 40 Jahren weiter gezüchtet worden.

In der folgenden Versuchsreihe war, wie übrigens in unseren sämtlichen Versuchsreihen, die kohlebehandelte Milch aus der zum Vergleich herangezogenen normalen Milch hergestellt. Die Titrierungszeit hängt von der Schnelligkeit ab, mit welcher die Bakterien in der Milch wachsen. Um die Zahlen der Tabelle III beurteilen zu können, muss erwähnt werden, dass die Streptokokken in kohlebehandelter Milch mit Laktoflavin als einzigem Zusatz höchstens 2 ‰ Milchsäure bilden können; gewöhnlich liegt die gebildete Milchsäuremenge um 1 ‰. Somit hat die Mischung von Nikotinsäureamid und Hefenucleinsäure nur gegenüber *Sc. cremoris* 24 und *Sc. mastitidis* 6, und vielleicht auch gegenüber *Sc. lactis* 8, keine aktivierende Wirkung ausgeübt. Gegenüber den anderen Streptokokken ist eine ganz deutliche Wirkung, die häufig ebenso gross wie die Wirkung des Milchbios ist, festzustellen.

Tabelle III.

Bakterienart		Titriert nach Tagen	Milch	
			Normal ohne Zusatz	Kohlebehandelt mit Laktoflavin und Ni+Nu
<i>Streptococcus lactis</i>	8.....	2	3.4	2.0
—	— 9.....	14	3.4	2.7
—	— 14.....	14	3.2	3.3
—	— 16.....	14	3.6	2.8
—	— 17.....	2	5.2	4.1
—	— 22.....	2	7.0	5.1
—	— 23.....	2	4.3	3.4
—	— 37.....	4	3.2	3.2
—	— 40.....	2	4.1	2.3
—	— 241.....	2	6.3	5.4
—	<i>cremoris</i> 11.....	2	6.8	6.5
—	— 18.....	2	3.8	2.3
—	— 24.....	2	4.7	1.6
—	— 37.....	2	6.8	6.1
—	— 40.....	2	5.0	2.0
—	— 193.....	2	7.7	7.1
—	— 294.....	2	5.2	2.9
—	— 385.....	2	4.3	4.1
—	<i>mastitidis</i> 6.....	2	5.9	1.1
—	<i>thermophilus</i> 5.....	2	4.1	3.2
—	— 7.....	2	7.4	4.7
—	<i>faecium</i> 1.....	4	3.4	2.3
—	— 8.....	2	4.7	3.2
—	<i>glycerinaceus</i> 4.....	3	3.4	2.3
—	<i>liquefaciens</i> 1.....	2	6.8	6.3

Nachdem somit bewiesen worden ist, dass Nikotinsäureamid und Hefenucleinsäure zu den Wuchsstoffen der Streptokokken gehören, haben wir versucht die opti-

malen Dosen derselben zu finden, und wir haben daher alle möglichen Kombinationen zwischen den bisher verwendeten Mengen $1 \text{ ‰ Ni} + 1 \text{ ‰ Nu}$ bis $0,001 \text{ ‰ Ni} + 0,001 \text{ ‰ Nu}$ geprüft. Nach KNIGHT wirkt die letztere Menge Ni, welche der von uns stets verwendeten Laktoflavinmenge entspricht, den Mikrokokken gegenüber noch deutlich.

Tabelle IV.

Milch	Zusätze	Sc. <i>lactis</i> 22	Sc. <i>lactis</i> 241	Sc. <i>cremoris</i> 11	Sc. <i>cremoris</i> 37	Sc. <i>cremoris</i> 193	Sc. <i>lique-</i> <i>faciens</i> 1
Normal	Ohne Zusatz	6.8	5.6	7.0	6.3	7.0	6.3
	1.000 ‰ Nu + 1.000 ‰ Ni	4.3	4.4	5.9	5.1	5.9	5.3
Kohlebehandelt mit Laktoflavin	1.000 - - +0.100 - -	4.2	4.2	5.4	4.7	5.5	5.3
	1.000 - - +0.010 - -	4.3	4.3	5.6	4.9	5.7	5.3
	1.000 - - +0.001 - -	4.3	4.3	5.4	4.9	5.6	5.2
	0.100 - - +1.000 - -	3.5	4.3	6.4	4.3	5.6	5.5
	0.100 - - +0.100 - -	3.7	4.5	6.3	4.6	5.6	5.6
	0.100 - - +0.010 - -	3.8	4.5	6.2	4.6	5.5	5.6
	0.100 - - +0.001 - -	3.9	4.5	6.4	4.5	5.4	5.4
	0.010 - - +1.000 - -	3.6	3.8	6.3	3.8	5.4	5.1
	0.010 - - +0.100 - -	3.8	4.1	5.9	4.1	5.2	4.6
	0.010 - - +0.010 - -	3.7	4.1	5.9	4.1	5.3	4.6
	0.010 - - +0.001 - -	3.5	4.1	5.9	4.3	5.2	4.7
	0.001 - - +1.000 - -	3.4	3.9	6.1	3.9	5.4	4.6
	0.001 - - +0.100 - -	3.6	4.1	6.1	4.3	5.4	4.6
	0.001 - - +0.010 - -	3.9	4.1	5.9	3.8	5.4	4.6
	0.001 - - +0.001 - -	4.0	4.1	5.9	4.1	5.4	4.5
	Ohne Zusatz	1.4	1.4	1.6	1.6	2.9	2.3

Aus Tabelle IV ersieht man, dass die kleinsten verwendeten Mengen Nu und Ni fast ebenso stark wirken wie die grössten. In einigen Fällen scheint das Optimum mit $0,1 \text{ ‰ Nucleinsäure}$ (die unter *Sc. lactis* 241, *Sc. cremoris* 11 und *Sc. liquefaciens* 1 kursivgedruckten Zahlen) erreicht zu sein, und einige Anzeichen deuten darauf hin, dass man nicht zu viel Ni im Verhältnis zu Nu verwenden darf. Wir machen darauf aufmerksam, dass unser Nikotinsäureamid ein besonders reines, von Prof. HAKON LUND (Aarhus) hergestelltes Präparat mit hohem Schmelzpunkt war, und wir benutzen hier gerne die Gelegenheit, Prof. HAKON LUND für seine Mühe unseren besten Dank auszusprechen.

Gegen die soeben besprochenen Versuche können zwei Einwände erhoben werden, nämlich erstens, dass die kohlebehandelte Milch möglicherweise schon einen Teil der zu prüfenden Stoffe enthält, und zweitens, dass sie eventuell andere Aktivatoren enthält, die mit der aktiven Kohle nicht entfernt worden sind, und ohne welche Nucleinsäure und Nikotinsäureamid nicht wirken können.

Was den ersten Einwand betrifft, so steht fest, dass, wenn die kohlebehandelte

Milch überhaupt Nu oder Ni enthält, die Menge dieser Substanzen jedenfalls wesentlich geringer sein muss als die kleinsten der von uns geprüften Mengen, denn die in der kohlebehandelten Milch ohne anderen Zusatz als Laktoflavin gebildete Säuremenge ist sehr gering. Der zweite Einwand lässt sich dagegen nur durch Wiederholung der Versuche mit rein synthetischen Substraten widerlegen.

Wie früher gezeigt, wachsen die Streptokokken mit Ammoniumsalzen als einziger Stickstoffquelle, wenn ihnen Milchbios und Laktoflavin zur Verfügung stehen. Das Wachstum wird jedoch durch Zusatz einiger Aminosäuren verbessert. Das im folgenden benutzte Substrat enthält pro Liter Leitungswasser 3,5 g Ammoniumcitrat, 2,4 g Histidin, 5,2 g Leucin, 0,8 g Kreatin und 0,8 g Asparagin (im ganzen 0,2 % N), ferner 5 g Dikaliumphosphat, 1 g Magniumsulfat, 1 g Chlornatrium, 0,01 g Ferri-chlorid und eine Spur von Zink- und Kupfersulfat (2 Tropfen einer Lösung, die 1 % jedes dieser Salze enthält). Als Zucker haben wir 2 % Traubenzucker benutzt, nur für die beiden in die Versuche einbezogenen Stämme von *Betacoccus arabino-saceus* haben wir 2 % Arabinose verwendet. Von Ni und Nu haben wir 1 %₀₀ genommen und haben sie mit und ohne 2 P geprüft. Gleichzeitig prüften wir ein uns von Dr. F. LIPMANN freundlichst überlassenes Präparat, das beide für die Alkoholgärung nötigen Coenzyme enthält; es wurde in der Menge 1 mg/l verwendet.

Tabelle V.

Aminosäurelösung mit Laktoflavin		Sc. <i>lactis</i> 22	Sc. <i>lactis</i> 241	Sc. <i>cremoris</i> 11	Sc. <i>cremoris</i> 37	Sc. <i>cremoris</i> 193	Sc. <i>thermo- philus</i> 7	Sc. <i>lique- faciens</i> 1	Bc. <i>arabino- saceus</i> 11	Bc. <i>arabino- saceus</i> 18
Ohne P.	Mit Bios	5.2	7.9	8.0	7.3	8.3	4.8	7.9	7.2	5.3
	- Ni+Nu	2.6	3.7	2.3	4.3	0.9	0.7	3.0	2.8	1.7
	- Cozymase	0.9	3.4	2.7	3.8	0.9	0.7	2.0	1.8	0.9
	Ohne Zusatz	0.5	2.0	0.9	2.3	1.0	0.7	2.4	1.8	0.8
Mit 2 P.	— —	1.6	2.9	3.0	3.2	2.3	2.0	3.6	2.3	0.8
	Mit Cozymase	3.6	4.7	4.5	4.5	3.6	2.7	3.2	2.5	1.1
	- Ni+Nu	3.8	5.4	6.1	4.5	4.1	2.7	4.5	3.2	1.8

Aus Tabelle V geht hervor, dass sowohl die geprüften Streptokokken wie Beta-kokken sehr gut in unserer synthetischen Nährlösung mit Bios und Laktoflavin gedeihen. Die Mischung Ni + Nu hat meistens eine merkbare Wirkung, ist aber doch nie imstande, das Milchbios vollständig zu ersetzen, auch dann nicht, wenn äther-lösliche Biosbestandteile (2 P) zugesetzt werden. Es müssen deshalb in der kohle-behandelten Milch noch Aktivatoren vorhanden sein, die beim Eluieren nur teilweise entfernt werden. Dass diese unbekanntenen Aktivatoren auch im Eluat vorhanden sind, geht daraus hervor, dass das Milchbios imstande ist, synthetischen Nährlösungen die volle Aktivität gegenüber Streptokokken beizubringen.

Es ist interessant zu sehen, dass laut Tabelle V das benutzte Cozymasepräparat eine ähnliche wachstumsfördernde Wirkung ausübt wie Ni + Nu. Es lag deshalb

nahe zu prüfen, ob Hefenucleinsäure sich durch die einfacher zusammengesetzte Adenylphosphorsäure ersetzen lässt. Dies ist auch der Fall, nur schien Hefenucleinsäure ein zuverlässigeres Aktivierungsmittel zu sein als Adenylphosphorsäure. Bei vergleichenden Versuchen geschah es nämlich hie und da, u. a. gegenüber *Sc. lactis* 22, dass die Aktivierung mit Adenylphosphorsäure ganz versagte. Nachdem ALBERT FISCHER gezeigt hat, dass der tierische Wuchsstoff, welcher zur Heilung von Wunden und zur Regeneration verlorener Körperteile beiträgt, wahrscheinlich ein Nucleoproteid ist, versuchten wir auch diesen Stoff gegenüber den Milchsäurebakterien anzuwenden. Ein uns zu diesem Zweck von ALBERT FISCHER freundlichst überlassenes, aus fötalem Kalbsgewebe hergestelltes Trockenpräparat wurde zum Teil durch Erhitzung, zum Teil durch Filtrierung entkeimt. Die Wirkung des Präparats wurde durch das Erhitzen nicht nennenswert abgeschwächt, was darauf deutet, dass die darin enthaltenen, gegenüber den Milchsäurebakterien wirksamen Bestandteile eher Nucleinsäuren als Proteine sind. Das Präparat, das wir F nennen, wurde für sich allein wie auch mit anderen Aktivatoren zusammen geprüft. Die anderen Aktivatoren waren in erster Linie Nikotinsäureamid (Ni) und Pantothensäure (P), und letztere war diesmal nicht aus Milchbios, sondern vorschriftsmässig aus Leber hergestellt¹. Ferner wurde ein neues *Merck*präparat von Vitamin B₆ und endlich ein Eidotterbios versucht. Das letztere wurde nach dem Verfahren von KÖGL zur Gewinnung von Biotin² hergestellt. Da sich indessen die Phosphorwolframsäurefraktion — die eigentliche Biotinfraktion — gegenüber Milchsäurebakterien unwirksam zeigte, gingen wir mit dem Reinigungsprozess nur bis zu dem Punkte, wo man mit Phosphorwolframsäure fällen soll. Ähnlich wie wir von Milchbios gewöhnlich die der normalen Milch entsprechende Menge verwendet haben, haben wir von Eidotterbios pro Liter Milch die Menge, welche einem Liter flüssigen Eidotters entspricht, verwendet. Nennen wir diese Menge E, so sind 2 E und 5 E das zweifache beziehungsweise fünffache dieser Menge.

Aus Tabelle VI geht hervor, dass der von ALBERT FISCHER isolierte, tierische Wuchsstoff F wie andere Nucleinsäuren auf das Wachstum der Milchsäurebakterien eine schwach aktivierende Wirkung ausübt, die durch Nikotinsäureamid erhöht wird. Ferner sieht man, dass die aus Leber hergestellte Pantothensäure (P) eine ähnlich aktivierende Wirkung wie die aus Milchbios hergestellte (vergl. Tabelle I) besitzt. Das neue Präparat von Vitamin B₆ ist wie die früher geprüften Präparate für sich allein ganz unwirksam, in Verbindung mit anderen Aktivatoren lässt sich indessen diesmal eine Wirkung nicht ganz ableugnen. *Tbm. helveticum* und *Tbm. jugurt* bilden näm-

¹ SNELL, STRONG and PETERSON: Growth Factors for Bacteria. Journal of Bacteriology 1939, Vol. 38 p. 291—308.

² KÖGL und TÖNNIS: Zeitschrift für physiologische Chemie 1936, Bd. 242. Das in dieser Arbeit verwendete Eluierungsmittel Aceton+Ammoniak gibt nach unseren Erfahrungen nicht so kräftige Biospräparate wie das von uns stets verwendete Eluierungsmittel Pyridin+Methylalkohol. Da wir nur mit 5 kg Eidotter gearbeitet haben, ist unser negatives Resultat bezüglich der Wirkung des Biotins keineswegs sicher. Wir bedauern sehr, dass reines Biotin für unsere Versuche nicht erhältlich war.

Tabelle VI.

Milch	Zusätze	<i>Tbm.</i> <i>lactis</i> 9	<i>Tbm.</i> <i>helveti-</i> <i>cum</i>	<i>Tbm.</i> <i>jugurt</i>	<i>Sbm.</i> <i>plan-</i> <i>tarum</i> 24	<i>Sc.</i> <i>lactis</i> 241	<i>Sc.</i> <i>cremoris</i> 37
Kohlbehandelt mit Laktoflavinzusatz	Ohne Zusatz	0.5	2.3	4.3	5.0	1.8	2.0
	B ₆ 1 mg/l	0.7	2.9	4.3	5.2	2.0	2.0
	P (die optimale Menge)	4.5	3.2	6.3	5.6	5.6	5.9
	B ₆ +P	0.9	5.0	8.1	4.7	5.0	5.9
	Ni 10 mg/l	2.5	1.8	5.2	—	4.1	2.9
	F 10 mg/l	2.0	2.9	5.4	4.5	2.0	2.3
	Ni+F	4.5	3.6	7.2	6.1	5.9	5.9
	P+F	5.0	4.3	7.2	5.0	5.2	5.9
	B ₆ +P+F	6.5	7.2	9.2	6.1	5.2	6.1
	B ₆ +P+Ni+F	7.4	7.2	9.0	5.9	5.9	6.5
	E	2.0	3.4	7.7	6.5	4.1	5.0
	2 E	4.1	3.6	7.4	8.3	5.0	5.6
	5 E	9.7	3.4	4.7	7.4	5.6	5.9
	Milchbios	14.6	11.0	17.6	7.9	7.4	7.0
	Normal	Kein	16.7	18.2	23.0	3.6	6.3
Nach Tagen		2		4		3	

lich mehr Säure mit B₆ + P als mit P allein (während andere Bakterien sich umgekehrt verhalten), und mit nur einer Ausnahme (*Sc. lactis*) bilden sämtliche geprüften Milchsäurebakterien mehr Säure mit B₆ + P + F als mit nur P + F.

Was das Eidotterbios (E) betrifft, so zeigt es eine deutlich aktivierende Wirkung, die gegenüber dem *Sbm. plantarum* ebenso stark ist wie die des Milchbios. Es ist von Interesse zu konstatieren, dass die für junge Vögel bestimmte Nahrung ähnliche Aktivatoren enthält wie die für junge Säugetiere bestimmte. Dass das Eidotterbios wie das Milchbios auch Hemmstoffe enthält, geht daraus hervor, dass E gegenüber *Tbm. jugurt* eine weit stärker aktivierende Wirkung ausübt als 5 E.

Da PAUL FILDES gezeigt hat, dass Glutamin das Wachstum der hämolytischen Streptokokken fördert, haben wir die Wirkung eines uns von diesem Forscher freundlichst überlassenen Glutaminpräparates gegenüber saprophytischen Streptokokken untersucht, ohne jedoch eine Aktivierung zu finden. Dies ist indessen in Übereinstimmung mit FILDES späteren Untersuchungen, bei denen er gefunden hat, dass die aktivierende Wirkung des Glutamins sich auf die pathogenen Streptokokken beschränkt¹.

Zuletzt haben wir noch verschiedene von NIELS NIELSEN gefundenen Hefewuchsstoffe gegenüber den Milchsäurebakterien geprüft und gefunden, dass sein vom *Aspergillus niger* auf synthetischem Substrat gebildeter Wuchsstoff B₂ (der mit Vitamin

¹ FILDES and GLADSTONE. Glutamine and the Growth of Bacteria. The British Journal of Experimental Pathology 1939, Vol. XX, p. 334.

Tabelle VII.

Zusätze		<i>Tbm.</i> <i>lactis</i> 9	<i>Tbm.</i> <i>lactis</i> 10	<i>Tbm.</i> <i>helveticum</i>
Aminosäure- mischung (mit Bios und Laktoflavin)	Ohne Zusatz	4.4	1.5	2.6
	Hefewuchsstoff B ₂ 4 ‰	6.9	2.8	3.4
	Luzerneextrakt 0.01 ‰ N	8.3	6.4	5.3
	Hefewasser —	9.1	5.1	4.9
	Pankreatin —	10.3	9.5	9.0
	Wittepepton —	15.1	10.6	2.7
Nach Tagen		4		

B₂ nichts zu tun hat)¹ auf die Thermobakterien aktivierend wirkt, was aus Tabelle VII hervorgeht.

Als Nährsubstrat verwendeten wir in diesem Versuch die von uns gefundene, für die Thermobakterien optimale Aminosäurelösung. Zum Vergleich haben wir einige der früher untersuchten Extrakte und Stoffe herangezogen. Pankreatin ist überall ein guter Aktivator, Wittepepton dagegen nur gegenüber den beiden Stämmen von *Tbm. lactis*. Es ist überhaupt merkwürdig, dass eine so schlechte Stickstoffquelle wie Wittepepton auf einige Milchsäurebakterien stark aktivierend wirken kann. Dies geschieht aber auch nur, wenn die Stickstoffnahrung durch Aminosäuren suppliert wird; dann erst kommt der besondere in diesem Pepton vorhandene Aktivator zur Geltung. Wir verweisen in diesem Zusammenhang auf die Tabellen 9, 10 und 11 in unserer Arbeit »Die Stickstoffnahrung der Milchsäurebakterien«², woraus hervorgeht, dass eine Mischung von Wittepepton mit Aminosäuren (oder Ammoniaksalzen) eine bessere Stickstoffquelle für die Milchsäurebakterien ist als Wittepepton allein. Schliesslich möchten wir auch die in der vorigen Arbeit gefundene, begünstigende Wirkung gewisser Aminosäuren auf die Wachstoffsstoffe in Erinnerung bringen.

¹ NIELSEN und HARTELIUS. Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie physiologique. 1938, Vol. 22, No. 1.

² Zentralblatt für Bakteriologie II. Abt. 1936, Bd. 94, S. 460—477.

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit sind bisher bekannte Bakterienaktivatoren als Ersatz für Milchbios geprüft worden. Die beste Wirkung erzielt man mit Nikotinsäureamid in Verbindung mit verschiedenen Nucleinverbindungen. Diese Kombination kann in kohlebehandelter Milch den meisten Streptokokken gegenüber das Bios ersetzen. In synthetischer Nährlösung gelingt dies dagegen nicht vollständig, auch nicht in Verbindung mit Pantothenensäure. Diese Säure, welche aktivierend auf alle Milchsäurebakterien wirkt, kommt unzweifelhaft im Milchbios vor.

Gegenüber den stäbchenförmigen Milchsäurebakterien ist die Wirkung der genannten Aktivatoren weit geringer (am besten wirken sie gegenüber *Tbm. jugurt*), und wir müssen deshalb gestehen, dass die Hauptbestandteile des Milchbios noch völlig unbekannt sind. Dies ist sehr zu bedauern, denn sie sind kaum in der Milch der Milchsäurebakterien halber, sondern weil sie für die Tiere, für welche die Milch bestimmt ist, und wahrscheinlich auch für die Menschen eine Rolle spielen.

Im Eidotter findet man ähnliche Aktivatoren wie in der Milch.

Aus dem biotechnisch-chemischen Laboratorium der Dänischen Technischen Hochschule,
Vorstand: Prof. Dr. S. ORLA-JENSEN.

Nach Abschluss dieser Arbeit gelang es uns eine geringe Menge Biotinmethylester zu erhalten, deren Wirkung auf sämtliche in der Tabelle 1 (S. 8-9) genannten Milchsäurebakterien geprüft wurde. Wir verwendeten die zehnfache Biotinmenge (4 γ /l), welche nach F. KÖGL das Wachstum der Hefe stark beschleunigt. Die Prüfung wurde sowohl mit kohlebehandelter Milch wie mit synthetischer Nährlösungen und sowohl ohne wie in Verbindung mit anderen Aktivatoren vorgenommen. Die genannte Biotinmenge zeigte indessen nicht die geringste aktivierende Wirkung weder auf die Thermobakterien, die Streptobakterien noch auf die Streptokokken, weshalb wir annehmen müssen, dass Biotin nicht zu den Wuchsstoffen der Milchsäurebakterien gehört.