

OM OPRINDELSEN TIL KOMÆLKENS OXYDASER OG REDUKTASER

AF

DR. PHIL. ORLA JENSEN

Forstander for den polytekniske Lærestalts landboteknisk-kemiske Laboratorium.

Da Mælk er en ægte Cellegrød, hvori efter OTTOLENGHI¹ ikke blot Kirtelcellernes Indhold (særlig deres Kerner), men ogsaa en Mængde Leukocyter i mere eller mindre forandret Tilstand, gaar over, saa er det kun naturligt, at man deri træffer paa flere forskellige Enzymer.

I Mælk udvikler der sig imidlertid meget hurtigt et stort Antal Bakterier, der ligesaa godt som de højere Organismers Celler indeholder og tildels udskiller Enzymer, og man kan derfor ikke paa Forhaand vide, hvilke af Mælkens Enzymer der hidrører fra Moderdyret, og hvilke fra Bakterierne.

Med nærværende lille Afhandling skal jeg søge at klare dette Spørgsmaal for de Oxydasers og Reduktasers Vedkommende, som findes i Komælk. For bedre Forstaaelses Skyld forudskikker jeg nogle almindelige Bemærkninger om Oxydaser og Reduktaser.

Foruden ægte Oxydaser, der kan aktivere Luftens Ilt, kendes ogsaa Peroxydaser, der kun formaar at aktivere Overiltens (specielt Brintoveriltes) Ilt. Disse Enzymer paavises ved de Farvereaktioner, som de frembringer med visse letiltelige Stoffer, saasom Guajakinkturler og Parafenylen-diamin. Herved omdannes Guajakonsyren til Guajakblaet og Fenylen-

¹ Beitrag zur Histologie der funktionierenden Milchdrüse. Archiv f. mikroskopische Anatomie 1901, 4. Hefte.

diaminet til rødviolet Indofenol, der, som V. STORCH har vist¹, med Kasein danner et mørkeblaat Farvestof, hvorfor en (2 0/0-holdig) Parafenyldiaminopløsning særlig egner sig til Paa-visning af Mælkens Oxydaser.

Da Peroxydase kun kan ilte et Stof, naar det samtidig reducerer et andet, saa danner den i Virkeligheden en Overgang til Reduktaserne. Et Skridt videre i denne Retning kommer vi med Katalasen, der af RAUDNITZ kaldes Superoxydase², men af LOEW regnes til Reduktaserne³, idet den spalter Brintoverilte uden at aktivere den frigjorte Ilt. Denne Spaltning kan derfor ikke finde Sted efter Ligningen: $H_2O_2 = H_2O + O$, men kun efter Ligningen: $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$. Det er imidlertid at antage, at Katalase — som Overgangsledet imellem Oxydaser og Reduktaser — alt efter Omstændighederne snart begunstiger de førstes og snart de sidstes Virkninger, og heri ligger vel netop dens store Betydning for den levende Celle, idet alle deri foregaaende kemiske Processer — med Undtagelse af de simple hydrolytiske — kun lader sig forklare ved afvekslende Oxydationer og Reduktioner.

Ligesom man kender Oxydaser, der virker direkte iltende, og saadanne, der kun virker iltende ved Hjælp af et Oxydationsmiddel, saaledes kender man ogsaa Reduktaser, der virker direkte reducerende, og saadanne, der kun virker reducerende ved Hjælp af et Reduktionsmiddel „Formaldehyd“. Disse sidste, der hidindtil kun er fundne i Mælk, kaldes Aldehydkatalaser. Begge Slags Reduktaser paavises med Indigokarmin, Lakmus eller Metylenblaat, som de overfører i de tilsvarende Leukoforbindelser. Metylenblaat, der ingen Ilt indeholder og derfor ikke kan reduceres ved Afiltning, men kun ved Brintning, er følsomst. Til Mælk (10 cm³) anvender man i Reglen tre Draaber af følgende Opløsninger:

¹ En kemisk Prøve til at afgøre, om Mælk eller Fløde har været opvarmet til mindst 80°. Forsøgslaboratoriets 40. Beretning. 1898.

² Chemie und Physiologie der Milch. Ergebnisse der Physiologie 1903.

³ United States Departement of Agriculture. Washington 1901. S. 1.

5 cm³ mættet alkoholisk Opløsning af Metylenblaat + 195 cm³ Vand,
 5 cm³ — — — — — + 190 cm³ —
 + 5 cm³ Formalin.

Den sidste Opløsning „SCHARDINGER's Reagens“¹ tjener naturligvis specielt til Aldehydkatalasens Paavisning. Mælken blandes med Farvestoffet ved, at Reagensglasset vendes forsigtigt et Par Gange, og den overgydes derpaa — for at udelukke Luftens Ilt — med et 2—3 cm tykt Lag af flydende Paraffin. Reduktionen foregaar bedst ved 40—50°.

Foruden disse Reduktaser, som viser ægte Enzymkarakter, idet de tilintetgøres ved Opvarmning, har man i Gær, Æggehvide, Blod og i forskellige Organer fundet Stoffer, der formaar at reducere Svovl til Svovlbrinte, hvorfor de af POZZI-ESCOT² er blevne kaldte „Hydrogenaser“. De affarver i Reglen ikke de ovennævnte Farvestoffer og kan med Undtagelse af Gærens „Philothion“, der efter HAHN³ allerede svækkes ved 65°, taale Kogning. De kan derfor ikke betragtes som Enzymer, men er simpelthen Æggehvidestoffer, og Svovlbrintedannelsen skal efter HEFFTER's Undersøgelser⁴ skyldes deres merkaptanlignende Grupper. Merkaptaner — særlig de aromatiske — iltes nemlig let til Disulfider, hvorved tilstedeværende frit Svovl samtidig reduceres.

Med Undtagelse af de direkte Oxydaser, der efter BACH's seneste Undersøgelser⁵ skal være Blandinger af Peroxydaser og Oxygenaser, α : af peroxydaktiverende og peroxyddannende Enzymer, findes der i Komælken Repræsentanter for alle de ovennævnte oxyderende og reducerende Stoffer. Mælkens Peroxydase blev paavist af ARNOLD 1881⁶ ved Hjælp af Guajak-tinktur, dens Katalase af BABCOCK 1889⁷ og dens Reduktase

¹ Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genussmittel. 1902.

² Bull. Soc. Chimique. 1902. Bd. 27. S. 557.

³ Die Zymasegärung. Buchner und Hahn. 1903.

⁴ Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie. 1904. S. 213.

⁵ Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. 1906. S. 2126.

⁶ Archiv der Pharmazie, Bd. 219. S. 41.

⁷ Agricultural Experiment Station, Madison. Bulletin 18.

af DUCLAUX¹ ved Hjælp af Indigokarmin. SMIDT erkendte 1904² Aldehydkatalasen som et fra den almindelige Reduktase forskelligt Enzym. At Mælk nu og da — men ingenlunde altid — kan danne Svovlbrinte af Svovl er første Gang iagttaget af RÖSING 1891³. Vi skal nu gaa over til at omtale de enkelte af disse Mælkeenzymmer nærmere.

Peroxydase. Efter de allerede citerede Undersøgelser af STORCH er Mælkens Peroxydase i fuldstændig Opløsning. Af Valle lader den sig udsalte med svovlsurt Ammoniak. Den tilintetgøres ved, at Mælken opvarmes momentant til 80° eller (efter mine Undersøgelser⁴) 5 Min. til 75°, 30 Min. til 72.5° eller 5 Timer til 70°. Da Mælkens Tuberkelbaciller i Reglen dræbes ved kortere Opvarmning, saa har man her i Landet baseret Pasteuriseringsloven til Forhindring af Udbredelse af Tuberkulose hos Hornkvæget paa den af STORCH udarbejdede Metode til Peroxydasens Paavisning, og herved har dette Enzym faaet stor praktisk Betydning. Ogsaa ved den saakaldte Buddisering 3: mere eller mindre fuldstændig Sterilisering af Mælk ved Hjælp af Brintoverilte og svag Opvarmning, spiller Peroxydasen en væsentlig Rolle, idet det er denne — og ikke Katalasen⁵ —, der aktiverer Brintoveriltens Ilt og derved forhøjer dette Stofs desinficerende Virkning. Efter BUDDE⁶ gaar denne Reaktion livligst for sig ved 50—55°. Da herved efter BARTHEL's Undersøgelser⁷ Peroxydasen selv meget hurtigt gaar

¹ Le Lait. Paris 1894. S. 5.

² Hygienische Rundschau. Nr. 23.

³ Untersuchung über die Oxydation von Eiweiss in Gegenwart von Schwefel. Dissertation. Rostock.

⁴ Über den Einfluss des Erhitzens auf die Kuhmilch. Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1905.

⁵ Katalasen, der ikke kan aktivere Ilt, spiller ved Buddiseringen næppe anden Rolle end efter endt Reaktion at fjerne en Del af Brintoverilteoverskuddet. Helt udelukket er det dog ikke, at der ved Mælkens Katalase kan finde en Opløsning af Bakterier Sted, paa samme Maade som ved Blodets Katalase alle Blodlegemer opløses.

⁶ Om Sterilisation af Mælk med Brintoverilte. København 1905.

⁷ Sterilisering af mjölk medelst vätesuperoxid. Nordisk Mejeri-Tidning. 1903. Nr. 11.

til Grunde, saa kræver det stor Forsigtighed at foretage Prøven paa Peroxydase ved dennes Optimaltemperatur, hvor STORCH's Reaktion naturligvis er finest. Efter SELIGMANN¹ skal en ringe Mængde Formalin beskytte Peroxydasen imod at blive tilintetgjort ved Opvarmning, ja tilsat efter Opvarmningen skal den endog kunne reaktivere Mælk, der kun har været pasteuriseret ved 80—85°. Oxydationsmidler forhøjer og Reduktionsmidler forringer saaledes Peroxydasens Ømtaalighed overfor Varme.

Efter BARTHEL² skal Peroxydasen hidrøre fra den store Mængde Leukocyter, der gaar over i Mælken. Han har nemlig fundet, at den Slim, som udskiller [sig ved Mælkenes Centrifugering, for en stor Del bestaar af hvide Blodlegemer, og at en ringe Mængde af denne Slim eller af renavadskede Leukocyter sat til kogt Mælk bibringer denne den raa Mælks iltende Egenskaber. Dette beviser imidlertid kun, at en Del af Mælkenes Peroxydase utvivlsomt hidrører fra dens Leukocyter. Hovedmassen maa stamme fra en anden Kilde, thi den Kendsgerning, at dette Enzym er fuldstændigt opløst i Mælken, lader sig kun daarligt forene med Forestillingen om, at det skulde være knyttet til et Formelement. Selv om vi ogsaa antager, at ved de hvide Blodlegemers Beskadigelse en Del af deres Peroxydase kunde gaa i Opløsning, paa samme Maade som REISS³ har vist for Katalasens Vedkommende, saa maa dog altid en stor Del af disse Enzymer blive ved at være knyttet til Blodlegemerne og derfor udfældes med Kaseinet; men efter STORCH's Undersøgelser indeholder Mælkenes Kasein (udskilt med svovlsur Magnesia) intet Spor af Peroxydase. SPOLVERINI's Antagelse⁴, at dette Mælkeenzym for Planteædernes Vedkommende stammer fra Foderet, lader sig bedre bringe i Samklang med dets opløste Tilstand. Med Planteføden optages

¹ Zeitschrift für Hygiene etc. 1905. Bd. 50. S. 107.

² Milchzeitung 1899. S. 487.

³ Citeres senere.

⁴ Revue d'hyg. et de méd. inf. 1904. Nr. 2.

nemlig saa store Mængder Peroxydase, at det kun er rimeligt, om en Del deraf atter blev udskilt med Mælken. Og i Virkeligheden lykkedes det SPOLVERINI at vise, at en Gød, der var sat paa animalsk Kost, efter nogen Tid leverede en peroxydasefri Mælk. BARTHEL's og SPOLVERINI's Anskuelser stemmer imidlertid overens deri, at Peroxydasen tænkes udskilt af selve Moderdyret og ikke først frembragt af Bakterier.

For at vinde Sikkerhed for, at dette Standpunkt er rigtigt, skulde man helst forskaaffe sig ursteril Mælk og undersøge, om denne indeholder ligesaa meget Peroxydase som almindelig bakterieholdig Mælk. Dette er uheldigvis umuligt, thi, som alle nyere Undersøgelser viser, er Komælk allerede i Yveret inficeret med Bakterier. Man er derfor tvunget til at slaa ind paa en indirekte Bevisførelse og da først og fremmest undersøge, om de almindeligste Mælkebakterier overhovedet udskiller Peroxydase.

I dette Øjemed udsaaede jeg i steriliseret Mælk saavel Mikroorganismer, der er karakteristiske for den nymalkede Komælks Flora, som saadanne, der først udvikler sig ved Mælkens Henstand ved lavere eller højere Temperaturer, og endelig nogle aërobe Forraadningsbakterier, der uden at være typiske Mælkebakterier alligevel — paa Grund af deres store Udbredelse — findes i omtrent hver eneste Mælkeprøve. Til den første Gruppe (a, Tabel I) hører forskellige i Mælk indifferente Bakterier (saasom *Micrococcus candidans*, *Pediococcus A* og *Bacterium A*) og peptoniserende Kokker, baade saadanne, der ingen Syrer danner (saasom *Micrococcus A* og B), og Syredannere (saasom *Micrococcus casei liquefaciens* og *Micrococcus casei amari*). Til den anden Gruppe (b, Tabel I) hører først og fremmest Mælkesyrebakterierne (særlig *Bacterium lactis acidi*), Aërogenes- og Colibakterier, forskellige Gærarter og *Oidium lactis*, endvidere Propionsyrebakterier¹ og Smørsyre-

¹ Der er Grund til at antage, at de af v. FREUDENREICH og mig opdagede Propionsyrebakterier (Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz.

bakterier. Og endelig til den tredje Gruppe (c, Tabel I) hører Høbaciller (særlig *Bacillus mycoides*) Proteusarter og *Bacillus fluorescens liquefaciens*.

For at kunne prøve disse Mikroorganismer paa forskellige Udviklingsstadier blev der af hver enkelt anlagt en hel Række Kulturer. Da Peroxydase kun virker ved omtrent nevtral Reaktion, blev dannet Syre førend Prøvens Ud-førelse nøjagtig nevtraliseret. I ingen af Kulturerne frem-bragte STORCH'S Reagens nogen tydelig Blaaifarvning, hvilket beviser, at de almindelige Mælkebakterier ikke udskiller kende-lige Mængder af Peroxydase¹. Jeg skriver udtrykkeligt „ud-skiller“, thi uden Tvivl indeholder de fleste Mikroorganismer dette vigtige Aandedrætsenzym i deres Indre. Dette viste sig f. Eks. tydeligt i Mælkekulturerne af *Oidium lactis* og *Peni-cillium glaucum*, hvor Hyferne, men ikke den omgivende Vædske, ved Tilsætning af STORCH'S Reagens lidt efter lidt blev blaasorte. En meget svag Reaktion (men i ethvert Til-fælde stærkere end den tilsvarende Kontrolmælk) gav Kul-turerne af *Bacillus casei* γ (en Mælkesyrebakterie) og af for-skellige Stammer af *Bacillus fluorescens liquefaciens*. Da disse sidste alle reducerede Nitrat til Nitrit (ikke enhver Stamme af *Bacillus fluorescens liquefaciens* formaar dette), fandt jeg, at der var Grund til at prøve, om maaske en denitrificerende Bakterie *par excellence* skulde udskille en nævneværdig Mængde Peroxydase. Jeg podede derfor den af BURRI og STUTZER fundne *Bacillus denitrificans II* i Mælk. Den vokser kun langsomt deri og synes hverken at angribe Mælkesukkeret eller Kaseinet. Sørger man imidlertid for, at Kulturerne har 1906. S. 320) findes i den meste Komælk, kun er det meget vanskeligt at paavise dem.

¹ Da Kulturerne i Røglen ikke blev opbevarede længere end en Uge, skal jeg ikke kunne afgøre, om meget gamle Bakterieceller udskiller Per-oxydase. Dette er imidlertid højst rimeligt, thi ethvert nogenlunde re-sistent Endoenzym maa jo ved Cellevæggenes Forfald blive frit, saaledes som man kender det fra Gærens Endotryptase, der i gamle Gelatinekul-turer smelter Gelatinen.

tilstrækkelig Overflade (*Bacillus denitrificans* II er nemlig efter HJALMAR JENSEN¹, naar den ikke har Nitrat eller Nitrit til sin Raadighed, obligat aërob), saa har man efter 4—5 Dage ved 20° en kraftig Udvikling og — hvad der er det interessante — Udskilning af Peroxydase. Ikke blot Mælkekulturen, men ogsaa det deraf efter Kaseinets Udfældning fremstillede klare Filtrat giver STORCH'S Reaktion. Denne optræder rigtignok ikke momentant som i Mælk, der ikke har været ophedet, men tiltager lidt efter lidt i Styrke og opnaar først i Løbet af et Kvarters Tid samme Intensitet som i raa Mælk, og den er i Filtratet overhovedet ikke stærk, hvorfor man maa antage, at ogsaa i det foreliggende Tilfælde kun en ringe Del af Peroxydasen udskilles, og at Farvestoffet særlig dannes i Cellernes Indre, hvorfra det saa hurtigt diffunderer ud. Skulde *Bacillus denitrificans* II tilfældig udvikle sig i pasteuriseret Mælk eller Fløde (hvad der næppe er nogen Sandsynlighed for), saa kan dette for den øvede Iagttagere ikke give Anledning til nogen Fejltagelse. Denne Bakterie danner ogsaa direkte Oxydase, thi Kulturerne farves — omend kun i ringe Dybde — med frisk tilberedt Parafenyldiaminopløsning alene² uden Tilsætning af Brintoverilte. At de denitrificerende Bakterier saaledes producerer en større Mængde Oxydaser end de fleste andre Mikroorganismer, bekræfter HJALMAR JENSEN'S Teori, at Denitrifikationen i sit inderste Væsen ikke maa opfattes som en Reduktionsproces, men at det frie Kvælstof opstaar ved de denitrificerende Bakteriers Evne til at overføre løst bunden Ilt fra Kvælstoffets Iltter (saavel som fra Brintoverilte) til andre Stoffer, hvorved der frembringes den for deres Livsvirksomhed nødvendige Energi. Det skal endnu tilføjes, at de obligat aërobe Eddikesyrebakterier, i hvis Indre der er paavist en Oxydase, ikke udskiller saadanne Enzymer.

¹ Centralblatt für Bakteriologie. II. Abt. 1899. S. 716.

² Med ældre Opløsninger af Parafenyldiamin farves ogsaa den raa Mælk blaa uden Tilsætning af Brintoverilte.

I en Uge gamle Pilsnerølkulturer af *Bacterium aceti*, *Bacterium Pasteurianum* og *Bacterium Kützingianum* faldt STORCH's Reaktion — ogsaa efter Eddikesyre's Neutralisation — negativ ud. I alkoholfri Mælk vokser disse Bakterier overhovedet ikke¹.

Da raa Komælk i fuldkommen frisk Tilstand altid giver en kraftig Peroxydasereaktion, og da efter de foreliggende Undersøgelser ingen af de sædvanlige Mælkebakterier i Løbet af en hel Uge er i Stand til at udskille nævneværdige Mængder af Peroxydase, saa kan der ingen Tvivl være om, at dette Enzyms Forekomst i Komælken udelukkende maa skyldes Moderdyret.

Katalase. Efter samtlige Forskeres Angivelser skal Mælkens Katalase tilintetgøres ved en noget lavere Temperatur end det foregaaende Enzym. Medens Peroxydasens og Reduktasens Optimaltemperatur er 50°, saa virker Katalasen kraftigst ved Blodtemperatur.

I Modsætning til førstnævnte Enzym udfældes Katalasen med Kasëinet, hvorfor den maa tænkes at være mere eller mindre fast knyttet til dette Æggehvidestof eller til Mælkens Formelementer „Fedtkugler, Leukocyter og Mikroorganismer“, der ogsaa for største Delen rives med ved forsigtig Udskilning af Kasëinet.

Allerede BABCOCK iagttog, at Fløde er rigere paa Katalase end Sød-mælk, og denne igen rigere end skummet Mælk. Han bemærkede imidlertid ogsaa, at Centrifugefløde er mindre aktiv overfor Brintoverilte end isskummet Fløde, medens omvendt Centrifugemælk er mere aktiv end den haandskummede Mælk, samt at Centrifugeslimen besidder en næsten ligesaa stor Evne til at spalte Brintoverilte som Blod. Det følger heraf, at Katalasen hæfter til Mælkens Fedtkugler og ved voldsom Behandling (Centrifugering) tildels kan løsrives derfra og gaa

¹ Disse Forsøg med Eddikesyrebakterier blev udførte i Carlsberg-laboratoriet, og det er mig hermed en kær Pligt at takke Hr. Professor DR. EML. CHR. HANSEN, for den ved denne Lejlighed udviste store Imødekommenhed.

over i den øvrige Del af Mælken og ganske særlig i Centrifugeslimen. I Overensstemmelse hermed lykkedes det REISS¹ ved at ryste og centrifugere Mælken med Kiselgur at overføre Katalasen til denne sidste og ved at udvadske Fløden med Vand eller fysiologisk Kogsaltopløsning at bibringe disse Vædsker katalyserende Egenskaber. Sammenligner man hermed BARTHEL'S Iagttagelse, at Centrifugeslimen for en stor Del bestaar af Leukocyter, saa kan man ikke undgaa den Tanke, at Mælkens Evne til at spalte Brintoverilte hidrører fra disse Katalysatorer, at det er de hvide Blodlegemer, der oprindeligt klæber til Fedtkuglerne og ved Centrifugeringen løsriveres derfra og for største Delen aflejres i Centrifugeslimen. BABCOCK'S Iagttagelse, at Kolostrum, der jo er særlig rig paa Leukocyter, indeholder 10—15 Gange saamegen Katalase som almindelig Sødmælk, er i høj Grad egnet til at bekræfte vor Hypothese. Paa den anden Side har CHICK² fundet, at Mælk, der ved Opvarmning er gjort uvirksom overfor Brintoverilte, kan reaktiveres ved at podes med lidt raa Mælk og staa i nogen Tid. Dette tyder paa, at Mælkens katalytiske Virkning skyldes Mikroorganismer. SELIGMANN³, som det er lykkedes af Mælk at isolere en ikke peptoniserende Kokkus med en overordentlig Evne til at spalte Brintoverilte, betvivler derfor ikke, at Mælkens katalytiske Virkning udelukkende maa tilskrives Bakterier. RAUDNITZ⁴, som har paavist Katalase i fuldkommen frisk Kvindemælk, mener, at SELIGMANN skyder over Maalet, endskønt han ingenlunde betvivler, at Mælkens Evne til at spalte Brintoverilte for en stor Del hidrører fra Mikroorganismer.

Som ved Peroxydase saaledes vil vi ogsaa ved Katalasen begynde vore egne Undersøgelser med at bestemme de almindelige Mælkebakteriers Evne til i Mælk at frembringe det

¹ Die Katalase der Milch. Zeitschrift klin. Medizin 1905. Bd. 56. S. 1.

² Centralblatt für Bakteriologie. 1901. II. Abt. S. 705.

³ Über die Reduktasen der Kuhmilch. Zeitschrift für Hygiene etc. 1906. S. 161.

⁴ Monatsschrift für Kinderheilkunde. 1906. Hefte 11.

omhandlede Enzym. For at maale Katalasen blev der til Eudiometre paa 30 cm³ Indhold sat 10 cm³ af en c. 1 0/0-holdig Brintoverilte, hvorpaa de blev fyldte med den Mælk-kultur, som skulde undersøges, hurtig lukkede med Fingeren, vendte om, stillede i en lille Skaal med lidt af den samme Kultur og hensatte 12 Timer ved 35°. Efter denne Tid aflæstes den udviklede Iltmængde, der tjener som Maal for Katalasen. Naturligvis gør denne Methode ikke Fordring paa at være kvantitativ, da der blandt andet i de Tilfælde, hvor der finder en meget voldsom Spaltning af Brintoverilten Sted, uundgaaelig undviger et Par Luftbobler, førend Endiometeret er stillet paa Plads, men den er nem, og naar den udføres paa samme Maade for alle Kulturer, saa viser den med tilstrækkelig Nøjagtighed Bakteriernes relative katalytiske Evne. Da denne — saavel som deres reducerende Egenskaber — afhænger af Kulturernes mere eller mindre gode Udvikling, anlagdes altid flere Kulturer af hver Mikroorganisme, og disse prøvedes paa forskellige Udviklingsstadier. De Tal, der er anførte i Tabel I, stammer fra de livskraftigste Kulturer. Denne Tabel angiver ogsaa de undersøgte Mikroorganismers reducerende Evne, der først vil blive omtalt senere.

Af omstaaende Tabel fremgaar, at der i Mælk findes et stort Antal Mikroorganismer — baade Bakterier, Gær og Skimmelsvampe — der kan spalte Brintoverilte. Det skal her gentages, at Kulturerne af alle disse Mikroorganismer (med Undtagelse af *Bacillus denitrificans* II) ikke giver STORCH'S Reaktion, hvilket altsaa viser den fuldstændige Uafhængighed imellem Katalase og Peroxydase, Enzymer, der — specielt for Mælkens Vedkommende — indtil de nyeste Tider ikke er blevne holdt ud fra hinanden. Da der under de forhaanden-værende Omstændigheder ikke kunde dannes stort mere end 27 cm³ Ilt af den anvendte Brintoverilte (denne indeholdt 0,83 0/0 H₂O₂), saa kan man i de Tilfælde, hvor denne Mængde er udviklet, af Tabellen ikke se, om de paagældende 20 cm³

Tabel I.

Mikroorganismernes Navne		Mikroorganismernes Gruppe eller Egenskaber	cm ³ Ilt udviklet med Brintoverilte i Løbet af 12 Timer	Reduktionstid i Minutter	
a	<i>Micrococcus candicans</i>	Indifferente Bakterier	27	4	
			<i>Pediococcus</i> A	4	meget lang
			<i>Bacterium</i> A	4	meget lang
	<i>Micrococcus</i> A (hvid)	Peptoniserende Kokker uden Syredannelse	8	9	
	<i>Micrococcus</i> B (gul)	Peptoniserende Kokker med Syredannelse	27	3	
	<i>Staphylococcus pyogenes aureus</i>	Peptoniserende Kokker med Syredannelse	16	10	
	<i>Micrococcus casei liquefaciens</i> ¹		19	5	
	<i>Micrococcus casei amari</i> ²		0	0	
	b	Streptokokk isoleret af Emmentalerost ³	Mælkesyrebakterier	0	"
				<i>Bacterium lactis acidi</i>	0
<i>Bacillus casei a</i> ⁴				0	20
— — ε				0	meget lang
— — δ				0	40
<i>Bacillus aërogenes</i>		Aërogenesbakterier	0	60	
			<i>Bacillus Schafferi</i> ⁵	9	10
			<i>Bacillus Guillebeau</i> c ⁶	9	12
			<i>Bacillus coli communis</i>	8	"
			<i>Bacterium acidi propionici</i> a ⁷	3	12
c	Propionsyrebakterier	18	8		
		<i>Bacillus acidi propionici</i>	0	5	
	Smørsyrebakterier	Bevægelig Smørsyrebakterie isoleret af Schabzieger ⁸	0	2	
		<i>Paraplectrum foetidum</i> ⁹	0	2	
	Høbaciller	<i>Bacillus subtilis</i>	0	5	
		<i>Bacillus mycoides</i>	7	12	
		<i>Tyrothrix tenuis</i> ¹⁰	20	7	
		<i>Bacillus Proteus vulgaris</i>	27	7	
		<i>Bacillus Proteus Zopfii</i>	27	5	
	Farvestofproducerende Bakterier	<i>Bacillus prodigiosus</i>	27	7	
<i>Bacillus fluorescens liquefaciens</i>		22	22		
<i>Bacillus phosphorescens</i>		"	2		
Denitrificerende Bakterie	<i>Bacillus denitrificans</i> II	1	10		
	Gær	Mycoderma isoleret af Naturløbe ¹¹	5	20	
		KAYSER'S mælkesukkerforgærende Gær	2	15	
Skimmelsvamp	<i>Oidium lactis</i>	17	15		

¹ Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1904 (Biologische Studien über den Käseerigungsprozess etc.)
² — — — — — 1896.
³ — — — — — 1906 (Über die im Emmentalerkäse stattfindende Milchsäuregärung.)
⁴ — — — — — 1904.
⁵ — — — — — 1890.
⁶ Annales de micrographie 1890. S. 353.
⁷ Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1906 (Über die im Emmentalerkäse stattfindende Propionsäuregärung.)
⁸ — — — — — 1906 (Über die im Schabzieger stattfind. Buttersäuregärung.)
⁹ Centralblatt für Bakteriologie etc. II. Abt. 1896. S. 156, 207 og 1898. S. 820.
¹⁰ Duclaux. Le Lait. Paris 1894.
¹¹ Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz 1906 (Bakteriologische Studien über Labmägen und Lab.)

Kultur ikke havde formaaet at spalte endnu mere Brintoverilte. Dette er saaledes *Micrococcus* B, der næsten spaltes Brintoverilten eksplosionsagtigt, og *Micrococcus candidans*, der ogsaa havde tilendebragt Iltudviklingen i faa Minutter, i Stand til. *Bacillus prodigiosus* og de to Proteusarter arbejdede derimod mere sindigt og naaede først at faa dannet de 27 cm³ Ilt i Løbet af 1—2 Timer, hvorfor man maa antage, at denne Iltmængde ligger ved Grænsen af deres Ydelse.

I Modsætning til disse Bakterier besidder Mælkesyre- og Smørsyrebakterier slet ingen Evne til at spalte Brintoverilte, og de fleste andre Syredannere kun en svag Evne. *Micrococcus casei amari*, den peptoniserende Kokkus, og *Bacillus acidi propionici*, den Propionsyrebakterie, der af Mælkesukker frembringer de største Syremængder, formaar saaledes heller slet ikke at spalte Brintoverilte. Dette Forhold hidrører ikke simpelthen fra, at den dannede Syre hæmmer Katalysens Virkning, thi de fleste af de paagældende Bakterier blev ogsaa prøvede, netop som deres Kulturer var paa Inkubationsstadiet, hvor Cellerne er kraftigst, men hvor der endnu kun er dannet et Spor af Syre, endvidere undersøgte ældre Kulturer efter at den producerede Syre var nøjagtigt neutraliseret, og endelig blev saavidt muligt sukkerfrie (flere af disse Bakterier vokser ikke uden Sukker) og derfor ogsaa næsten syrefrie Peptonbouillonkulturer undersøgte, men overalt med det samme Resultat. Naturens Økonomi gør sig saaledes gældende, idet der ikke dannes Katalase af Bakterier, der normalt lever i sure Substrater og derfor alligevel ikke kunde bruge den. Disse for det meste fakultativt eller endog obligat anaerobe Bakterier behøver heller ingen Aandedrætsenzymmer, thi de forskaffer sig den nødvendige Energi ved Mælkesukkerets Spaltning.

Som en Kendsgærning, der vanskeligere lader sig forklare, staar det mærkelige Forhold, at den aerobe *Bacillus subtilis* dyrket i Mælk ingen Katalase frembringer, medens Mælkekulturer af

nær beslægtede Former som f. Eks. af *Tyrothrix tenuis* sønderdeler Brintoverilte ret livligt. Bouillonkulturer af *Bacillus subtilis* udøver imidlertid en ringe katalytisk Virkning.

Da Bakteriekatalasen ikke lader sig skille fra Cellerne, maa den enten være et Endoenzym, eller dens Virkning er at opfatte som et direkte Udslag af Bakteriernes Livsvirksomhed.

Af særlig Betydning for vor Undersøgelse er, at de Bakterier, der udøver den største katalytiske Virkning, netop hører til den friske Mælks sædvanlige Flora. Der er saaledes i og for sig intet til Hinder for, at den nymalkede Mælks Katalase kunde hidrøre fra Bakterier. Vi skal forsøge at træde dette Spørgsmaal lidt nærmere.

Som tidligere nævnt synes Mælkens Katalysatorer — hvad enten de nu er Leukocyter eller Mikroorganismer — at hæfte til Fedtkuglerne. Da de Forsøg, hvorved dette Forhold blev iagttaget, foretoges med almindelig Handelsmælk, kunde der være Grund til at undersøge, om Mælkekuglerne, allerede naar de forlader Koens Yver, er Katalysatorernes Sæde, eller om de først senere adsorberer disse. Denne Undersøgelse begunstiges ved det bekendte Forhold, at Mælkens Fedtindhold tiltager under Malkningen; man behøver derfor blot — under Varetagelse af den størst mulige Renlighed ved Malkningen — at opsamle forskellige Fraktioner af Mælken direkte i sterile Glas og øjeblikkelig undersøge deres katalytiske Virkning. Skulde denne stige med Fedtindholdet, saa maatte Fedtkuglerne ogsaa *in statu nascendi* være Katalysatorernes Sæde, hvilket yderligere vilde tale for, at disse sidste er Leukocyter og ikke Mikroorganismer. Samtidig blev Mælkefraktionernes Bakterieantal bestemt, for at det kunde fastslås, om der er noget Forhold imellem dette og den ved Brintoveriltens Sønderdeling udviklede Iltmængde. Tabel II viser Resultatet af disse Undersøgelser angaaende den første, den midterste og den sidste Fraktion af to Køers Mælk. Hver Fraktion, der bestod af omtrent 50 cm³ Mælk, hidrørte saavidt muligt ligeligt fra

alle fire Patter, hvorfor Kørerne blev malkede med dette Formaal for Øje. Tabel II indeholder ogsaa Resultaterne fra de analoge Forsøg for Aldehydkatalasens Vedkommende; disse vil blive omtalt senere.

Tabel II.

Koens Navn	Mælkefraktion	% Fedt i Mælken	Antal Kolonier udviklet paa Peptongelatineplader efter 6 Dage ved 20° pr. cm ³ Mælk	cm ³ Ilt udviklet med Brintoverilte i Løbet af 12 Timer	Reduktionstid i Minutter med SCHARDINGER'S Reagens	
Kreuz ..	Første	0.55	16000 ¹	Et Spor	Affarvningen blev først synlig efter 3 Timer og blev aldrig fuldstændig	
	Midterste	2.70	480	0.5		120
	Sidste	8.30	360	2.0		15
Meise ..	Første	1.50	3200	0.5	90	
	Midterste	3.40	2800	1.0	75	
	Sidste	7.80	360	1.5	14	
Spiegel ..	Første	1.70	"	"	105	
	Midterste	3.35	"	"	80	
	Sidste	6.40	"	"	16	

¹ Den forholdsvis store Mængde Bakterier i den første Mælkefraktion hidrører fra, at der har dannet sig „Bakteriepropper“ i Patternes Udførselsaabninger; saasnart disse er udskyllede, aftager Bakteriernes Antal. De fundne Bakterier var i alle Fraktionerne indifferente og peptoniserende Kokker.

Denne Tabel viser tydeligt, at Mælkens katalytiske Evne lige fra Begyndelsen af er knyttet til Fedtkuglerne, og at den — for den nymalkede Mælks Vedkommende — ikke staar i Forhold til Bakteriemængden. Man kunde nu spørge, om den da er proportional med Leukocyt mængden. En mikroskopisk Undersøgelse med Hæmatoxylin som Farvningsmiddel viser, at den sidste fedtrige Mælkerest, som udpresses ved Malkningen, virkelig er rigere paa hvide Blodlegemer end de tidligere Mælkeportioner, i hvilke man ofte kan have ondt ved at paavise dem, saa der kan ikke være nogen Tvivl om, at den friske Mælks Evne til at spalte Brintoverilte hovedsagelig maa tilskrives Leukocyterne. Denne Evne er imidlertid meget ringe, som de ovenstaaende Tal viser, og den taaler ingen Sammenligning med visse Bakteriernes Evne i denne Henseende,

saa der kan heller næppe være nogen Tvivl om, at den tiltager i høj Grad ved disse Bakteriers Udvikling. Alt efter den fremherskende Bakteriefloora kan derfor Mælkens katalytiske Virkning være meget forskellig. LAM¹ fandt for god Komælk lignende „Katalasetal“, α : Antal cm³ Ilt, som vi, nemlig 0.6–2, og han angiver, at dette Tal vokser betydeligt ved Yversygdomme (Mastitis og Tuberkulose), hvad der jo efter foranstaaende er let forklarligt, idet herved Mælkens Indhold ikke blot af Bakterier, men ogsaa af Leukocyter og endog af røde Blodlegemer (de kraftigste af alle Katalysatorer) forøges. LAM mener, at Mælk med et højere Katalasetal end 6 fra et hygiejnisk Standpunkt maa anses for ubrugelig. Vi tillader os imidlertid at betvivle dette, thi Tabel I viser tydeligt, at Udviklingen af ret uskyldige Mælkebakterier kan forhøje Katalasetallet langt op over denne Grænse. I de af BABCOCK undersøgte Sødælksprøver varierede Katalasetallet (omregnet saaledes, at det kan sammenlignes med vore Tal) fra 3 til 20. Denne Forsker har iøvrigt iagttaget, at Mælkens Evne til at spalte Brintoverilte aftager ved Henstand og efter fire Dages Forløb næsten helt gaar tabt. Dette synes at stride imod ovenstaaende Betragtningensmaade, thi jo længere Mælken staar (indtil en vis Grænse naturligvis), desto stærkere maa Bakterierne formere sig deri. Man maa imidlertid ikke glemme, at det i Mælk under normale Forhold ikke varer længe, førend Mælkesyrebakterierne har saa fuldstændigt Overtaget, at de undertrykker de fleste andre Bakterier, og da Mælkesyrebakterierne ingen Katalase danner, maa herved Mælkens Evne til at spalte Brintoverilte aftage og paa Grund af Syretilvæksten tilsidst helt gaa tabt.

Da den katalytiske Virkning af den Mælk, som gaar i Handelen, kan være saa meget forskellig, er det indlysende, at man ikke een Gang for alle, saaledes som BUDDE gør, kan

² Meddelelse ved den internationale Kongres for anvendt Kemi, Rom 1906.

foreskrive, at en vis Mængde Brintoverilte er tilstrækkelig til at sterilisere en vis Mængde Mælk. Hvis man ikke vil risikere at komme til at anvende et stort Overskud af Brintoverilte, maa man i hvert enkelt Tilfælde bestemme den nødvendige Mængde deraf, og dette vil i Praksis næppe være gennemførligt. Det uheldige ved Buddiseringen er yderligere, at her ved — ligesom ved Pasteuriseringen — de farlige Bakteriens Sporer i Reglen ikke dræbes, medens Mælkesyrebakterierne, der normalt beskytter Mælken imod skadelige Forandringer, først og fremmest gaar til Grunde, særlig da de ikke ved at sønderdele Brintoverilten er i Stand til at forsvare sig imod dette Stofs giftige Virkning.

Reduktase. Da fuldkommen frisk Mælk ikke affarver formalinfri Metylenblaatopløsning, men denne Egenskab først udvikles ved Mælkens Henstand og tiltager lige indtil dens Sammenløbning, saa kan der ikke være nogen Tvivl om, at det, man kalder Mælkens Reduktase, skyldes Mikroorganismer.

Ved at betragte Tabel I ser man, at omtrent alle Mælkens Mikroorganismer affarver Metylenblaat. Næsten momentant reduceres det af *Micrococcus casei amari*, og man kan gentagne Gange til denne Bakteries Kultur sætte smaa Mængder Metylenblaat, de affarves stadigt. Ogsaa Indigokarmin, som de fleste Mikroorganismer bruger meget lang Tid til at faa reduceret (sandsynligvis fordi Indigohvidtet ilter sig saa let igen), affarves i faa Minutter af denne mærkelige Kokkus. Den reducerende Evne er i det foreliggende Tilfælde knyttet til Cellen og gaar derfor ikke over i det bakteriefrie Filtrat. Til de kraftigst reducerende Bakterier hører iøvrigt *Bacillus phosphorescens*, de undersøgte Smørsyrebakterier og de stærkt katalyserende Kokker, *Micrococcus B* og *Micrococcus candicans*. Mælkesyrebakterierne, der jo, som omtalt, ikke spaltes Brintoverilte, reducerer i Reglen ogsaa langsomt. Nogen Parallelisme imellem reducerende og katalyserende Egenskaber finder ellers ikke Sted, hvilket tydeligst ses deraf, at Mælkekulturer

af nogle af de kraftigst reducerende Bakterier (saasom *Micrococcus casei amari*, Smørsyrebakterier og *Bacillus subtilis*) slet ikke spalter Brintoverilte. Metylenblaat affarves ogsaa ved sur Reaktion, men da de syredannende Bakterier selv svækkes, naar Syremængden stiger for stærkt, saa aftager derved ogsaa Kulturernes Reduktionsevne. I Tilfælde, hvor Bakterierne frembringer Svovlbrinte eller andre reducerende Stoffer, vil naturligvis ogsaa et Filtrat af den paagældende Kultur kunne virke reducerende.

Aldehydkatalase. Som tidligere nævnt har SMIDT tilskrevet den friske Komælks Evne til at reducere formalinholdig Metylenblaatopløsning et særligt Enzym, som han har kaldt Aldehydkatalase¹. Denne tilintetgøres ved Opvarmning til 78° og ved Tilsætning af for store Mængder Formalin (0.5 0/0). Da Peroxydasen virker i modsat Retning af Aldehydkatalasen, saa skal denne sidste undertiden (saaledes i Gedemælk) først kunne paavises, efter at den første er fjærnet. Som Katalasen saaledes er ogsaa Aldehydkatalasen knyttet til Mælkens Fedtkugler, men den lader sig, som SELIGMANN² har vist, i Mod-sætning til Katalasen ikke udvadske af Fløden, hvorfor den ikke kan stamme fra Leukocyter, der forøvrigt efter mine Undersøgelser ikke reducerer Metylenblaat³, men maa høre til selve Fedtkuglernes Bestanddele, f. Eks. til den af STORCH opdagede Membranslim. Dette Stof, som Hr. Professor STORCH var saa venlig at overlade mig lidt af, formaaede dog ikke at affarve SCHARDINGERS Reagens. Præparatet var imidlertid gammelt, saa det er dermed ikke udelukket, at frisk tilberedt Membranslim kan være i Besiddelse af denne Egenskab.

Tabel II illustrerer den friske Komælks Evne til at reducere formalinholdig Metylenblaatopløsning. Den viser end-

¹ Jeg finder, at Navnet „Aldehydreduktase“ vilde være mere overensstemmende med Navnet Peroxydase.

² Zeitschrift für Hygiene etc. 1906. S. 161.

³ Heller ikke udmærker det leukocytrige Kokolostrum sig ved nogen særlig Evne til at reducere SCHARDINGER's Opløsning.

videre tydeligt, at denne Evne er knyttet til Fedtkuglerne og er uafhængig af Bakteriemængden.

SELIGMANN paastaar, at Aldehydkatalase og Reduktase er identiske. Formalin — som et reducerende Stof — forhøjer blot Reduktasens Virkning og gør det saaledes muligt at paa- vise dette Enzym ogsaa i den stærke Fortynding, i hvilken det forekommer i den friske Mælk. Denne Betragtningssmaa- de er imidlertid ikke rigtig, thi hvis Formalin virkelig forstærkede den almindelige Reduktases Virkning, saa maatte alle Bakterie- kulturer affarve den formalinholdige Metylenblaatopløsning hur- tigare end den formalinfrie, og dette er ikke Tilfældet. Re- duktionstiden er her for ligestore Mængder af begge Opløs- ninger i Reglen nøjagtig den samme, ja undertiden lidt længere, ved Anvendelse af SCHARDINGER's Reagens, fordi Formalinet hæmmer Bakteriernes Livsvirksomhed. Underligt nok viser SELIGMANN's egne Forsøg¹ allerbedst Forskellen imellem Alde- hyd-katalase og Reduktase, idet Mælkeprøver, som i frisk Til- stand reducerede formalinholdig Metylenblaatopløsning for- holdsvis hurtigt, men aldeles ikke paavirkede den formalinfrie Opløsning, efter 3 Dages Henstand brugte lidt længere Tid end oprindelig til at reducere den første Opløsning, medens de affarvede den anden næsten øjeblikkelig.

Hydrogenase. Med Mælkens Evne til af Svovl at danne Svovlbrinte har jeg ikke selv beskæftiget mig, da dette Spørgs- maal i Forvejen var tilstrækkeligt belyst af HEFFTER². Denne Forsker fandt i Mælk ingen reducerende Æggehvide-stoffer, hvor- for Mælk i frisk Tilstand heller ikke formaar at reducere Svovl. Denne Egenskab opstaar derimod i Mælken, naar den uden Tilsætning af et Antiseptikum hensættes nogen Tid. Der kan derfor ikke være Tvivl om, at i de Tilfælde, hvor Mælk med Svovl udvikler Svovlbrinte, skyldes dette Fænomen Mikroorga-

¹ Zeitschrift für Hygiene etc. 1906. Bd. 52. S. 169.

² Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie 1904. Bd. V. S. 213.

nismer, og meget taler for, at Mælkens Hydrogenase og Reduktase er identiske.

Resumé.

1. Komælkens Peroxydase hidrører udelukkende fra Moderdyret og vistnok i Hovedsagen fra Foderet.
 2. Komælkens Katalase hidrører i Reglen for en mindre Del fra Moderdyrets Leukocyter (den nymalkede Mælks Katalase) og for største Delen fra Mikroorganismer.
 3. Komælkens Reduktase og Hydrogenase hidrører udelukkende fra Mikroorganismer.
 4. Komælkens Aldehydkatalase (den nymalkede Mælks Reduktase) hidrører udelukkende fra Mælkens Fedtkugler.
-