

Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung und Bildung der Enzyme.

XV. Mitteilung.

Neue Messungen an Bact. acidi lactis (Streptococcus lactis).

Von

Hans Euler und Olof Svanberg.

Mit 2 Kurvenzeichnungen im Texte.

Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.

(Der Redaktion zugegangen am 26. April 1918.)

I. Einfluß von Phosphat.

Vor mehreren Jahren sind im hiesigen Laboratorium von Dr. Herm. Meyer und von Dozenten Bj. Palm Versuche zum Studium der Enzyymbildung in Bact. acidi lactis unternommen worden, die zu keinen einheitlichen Ergebnissen geführt haben, da über Enzymgehalt und Gärungsverhältnisse der Milchsäurebakterien in quantitativer Hinsicht noch wenig bekannt war.

Um in dieser Hinsicht eine Grundlage zu schaffen, haben wir im vergangenen Jahr einige orientierende quantitative Messungen über den Verlauf der Milchsäurebildung durch Bact. casei ϵ angestellt, wobei es sich besonders um den Einfluß von Phosphat auf die Milchsäuregärung gehandelt hat (Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 148, 1917).

Bei den älteren Versuchen hatte sich mehrfach ergeben, daß bei der Milchsäurebildung durch Bact. acidi lactis in Gegenwart von Phosphat nach einiger Zeit eine Kohlensäureentwicklung einsetzte, sodaß nach den von E. Griese (Diese

Zeitschr., Bd. 100, S. 59, 1917) angestellten Kontrollversuchen das Auftreten eines zymaseähnlichen Enzyms in Betracht gezogen wurde. Indessen hat der eine von uns gleich hervorgehoben, daß «die Resultate nicht den Grad der Sicherheit erreicht haben, daß die ziemlich komplizierten Verhältnisse als geklärt angesehen werden können».

Das von E. Griese angewandte Ausgangsmaterial, eine Kultur aus dem bakteriologischen Institut der Zentralanstalt für das landwirtschaftliche Versuchswesen in Schweden, war zweifellos rein. Indessen wurde, wie in der genannten Mitteilung erwähnt, mehrfach das Gärungsmedium gewechselt, und die Kontrolle auf Reinheit erfolgte durch mikroskopische Beobachtungen direkt aus den Lösungen entnommener Proben. Bei der Schwierigkeit, einige der gerade hier in Betracht kommenden Bakterien, welche neben Milchsäure auch Kohlensäure bilden (*Bact. coli*, *Bact. aerogenes*), neben *Bact. lactis acidii* durch direkte mikroskopische Beobachtung nachzuweisen, war es trotz der früher angewandten Vorsichtsmaßregeln nicht ausgeschlossen, daß gegen Schluß der Versuche, wo die Kohlensäureentwicklung auftrat, eine Infektion durch solche Bakterien eingetreten war, welche normal neben Milchsäure auch Kohlensäure entwickeln. Die von E. Griese mit *Bact. lactis acidii* angestellten Versuche wurden deswegen nochmals einer Kontrolle unterworfen, sowohl hinsichtlich des Einflusses von Phosphat auf die Säuerung durch die genannten Bakterien, als hinsichtlich einer eventuellen CO_2 - bzw. Zymasebildung unter der Einwirkung von Phosphat.

Neue Messungen.

Eine Reinkultur von *Streptococcus lactis* (*Bact. lactis acidii*) verdanken wir wieder Herrn Prof. Chr. Barthel, Experimentalfältet Stockholm.

Die Bakterien wurden in steriler Magermilch gezüchtet und durch häufig vorgenommene Überimpfungen in steter Virulenz gehalten. Über das Säurebildungsvermögen dieser Bakterien seien folgende an Milchkulturen ausgeführten Messungen angegeben:

Temperatur: 15°.

Anzahl Tage nach der Impfung	p_H	Säuregrad n. Thörner ccm 0,1 n-NaOH per 100 ccm Milch
0	6,57	17,5
3	4,45	75,5
4	4,10	95,5
5	4,10	96,5
6	4,10	98,0
7	4,05	98,5
13	3,95	102,0

Versuch 1.

Es wurde gemischt:

A.

10 g NaH_2PO_4
 10 › Milchzucker
 125 ccm Molke, steril
 $p_H = 4,4$. Säuregrad 65.

B.

5 g Milchzucker
 60 › Molke

Hiervon wurden je 50 ccm zu Parallelversuchen in zwei 100 ccm-Kolben gebracht und nochmals sterilisiert. Beide Kolben wurden mit 1 ccm einer frisch koagulierten Bakterienkultur geimpft und im Wasserthermostat bei + 28° mit Quecksilberbüretten verbunden.

Gasentwicklung trat in keinem der beiden Kolben ein.

Die Vermehrung der Bakterienzellen war nur im Versuch B gut. Im Versuch A hingegen trat höchstens eine unbedeutende Vermehrung der Zellen ein. Eine Säuerung war auch nach 8 Tagen nicht nachweisbar.

Versuch 2.

Es wurde gemischt:

10 g NaH_2PO_4
 10 › Milchzucker
 200 ccm sterile Molke
 $p_H = 4,9$. Säuregrad 49.

Es wurden 2 Parallelversuche, beide mit Phosphat, angestellt. Die Impfung geschah wie beim Versuch 1 mit 1 ccm Reinkulturlösung. Versuchstemperatur: 28°.

Nach 10 Tagen betrug die Säuerung 49,6, also betrug die Zunahme 0,6.

Auch bei diesen Versuchen wurde keine Kohlensäureentwicklung beobachtet.

Versuch 3.

Milchsäuregärung mit und ohne Na-Phosphat bei $p_H = 6,7$, $p_H = 5$.

Es wurden vier Versuchsreihen mit je vier Kolben (100 ccm fassend) angestellt. In jedem Kolben 35 ccm Molke:

A	B	C	D	D
ohne Zusatz	0,2 ccm Milchsäure	<u>5% NaH₂PO₄</u>		
		mit 2 n-NaOH neutr. sauer		

Sämtliche 16 Kölbchen wurden 10 Minuten bei + 105° sterilisiert und nach der Abkühlung mit je einer Platinöse einer frisch koagulierten Kultur von Streptococcus lacticus (Bact. lactis acidii) geimpft. Versuchstemperatur + 18°. Von Zeit zu Zeit wurden die Kolben elektrometrisch, titrationsacidimetrisch und mikroskopisch (Methylenblaufärbung) untersucht. Dabei wurde zu jeder Versuchsreihe ein ganzer Kolben genommen, um die Versuche gegen Desinfektion vollkommen geschützt halten zu können.

In den Kolben A entwickelten sich die Kokken schnell und waren schon zwei Tage nach der Impfung ziemlich reichlich vorhanden. Auch in den Kolben C kamen sie zur Entwicklung, jedoch recht spärlich; in den Versuchsreihen B und D wurde keine Entwicklung beobachtet. Die Resultate der Titrierungen und p_H -Bestimmungen stehen damit im Einklang:

Anzahl Tage nach Impfung	A		B		C		D	
	Säure titrierbar	p_H	Säure	p_H	Säure	p_H	Säure	p_H
0	7,6	6,7	35	5,0	117	6,7	396	5,1
3	47,5	4,55	35	5,0	123	6,6	400	—
5	51	4,45	—	—	139	6,6	396	—
7	51	4,45	31	—	140	6,6	396	5,1

Nur in A und in C war eine Säuerung eingetreten. (Die Säuremengen sind mit 0,216 n-NaOH gegen Phenolphthalein aus-
titriert und nach Thörners Skala¹⁾ angegeben.) Das Maximum
der Säuerung dieses Bakterienstammes in Milch bei Zimmer-
temperatur beträgt $p_H = 3,9$ bis 4,0.

Kein Zeichen einer Gasentwicklung wurde be-
obachtet.

In früheren Versuchen haben wir an *Bact. casei* ϵ eine
Beschleunigung der Milchsäurebildung in saurer Lösung durch
Phosphat (etwa 1,7 g per 100 ccm Lösung) gefunden.

Bei den hier mitgeteilten Versuchen hemmt Phosphat
(5 g per 100 ccm Lösung) die Entwicklung von *Streptococcus*
lactis bei saurer, weniger bei annähernd neutraler Reaktion
($p_H = 6,6$).

Zunächst ist zu bedenken, daß sich bei den beiden unter-
suchten Arten Unterschiede in der Permeabilität gegenüber
Phosphat und gegenüber Alkali geltend machen können.

Andererseits beeinflussen Phosphate nicht selten auch bei
Hefen Gärwirkung und Zellenzuwachs in entgegengesetztem Sinne.

Die Gärtätigkeit der Hefen wird im allgemeinen bei zahl-
reichen Hefearten und Rassen durch Phosphate beschleunigt,
wenigstens in einem begrenzten Konzentrationsintervall. Wir
brauchen in dieser Hinsicht nur an die älteren Arbeiten von
Lintner,²⁾ von Elion,³⁾ sowie von zahlreichen französischen
Forschern zu erinnern (Kayser, Martinand, Langlade) so-
wie an Ergebnisse von Lundeqvist⁴⁾ aus dem hiesigen La-
boratorium. Das optimale Konzentrationsintervall scheint
allerdings bei verschiedenen Hefen nicht unerheblich zu variieren
(im allgemeinen wohl zwischen 0,4 und 2,0% Phosphat), die
Beschleunigung nimmt dann aber auch — wie z. B. bei der
von Elion untersuchten Brennereihefe — beträchtliche Beträge,
bis zu 60%, an.

¹⁾ Thörner-Grade = Anzahl ccm 0,1 n-NaOH, welche zur Titra-
tion von 100 ccm Lösung verbraucht werden.

²⁾ Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauw., Bd. 6, S. 397 (1883).

³⁾ Elion, Zentralbl. f. Bakt., Bd. 14, S. 53 und 97 (1893).

⁴⁾ Lundeqvist, Diese Zeitschr., Bd. 72, S. 97 (1911).

Die Entwicklung der Hefen wird hingegen durch Phosphate oft gehemmt, wie wir selbst neuerdings sowohl bei einer Hefe vom Froberg-Typus als bei unserer Brennerei-Oberhefe SB II zu beobachten Gelegenheit hatten.

II. Milchsäuregärung mit und ohne Na-Lactat.

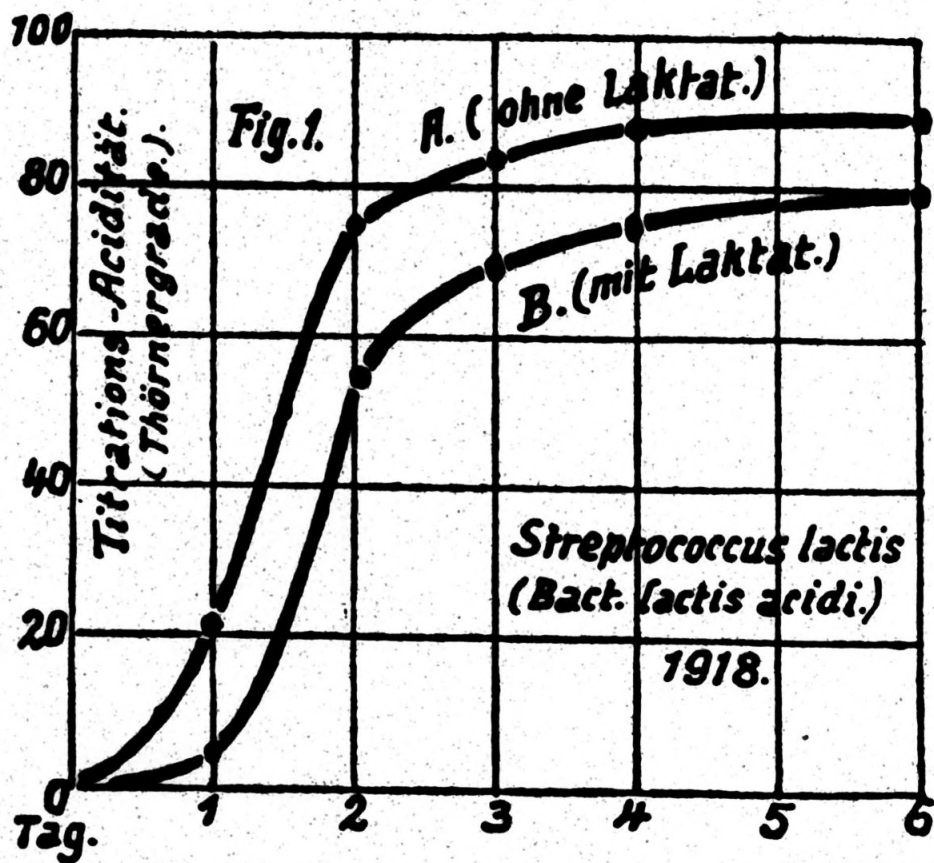
Die Frage, wie bei der Milchsäuregärung bereits vorhandenes Lactat auf den weiteren Verlauf der Gärung einwirkt, ist sowohl von theoretischem Interesse für das Verständnis des Reaktionsverlaufs als von praktischer Bedeutung für die Technik der Milchsäuregärung. Es werden deswegen einige frühere Versuche¹⁾ fortgesetzt. Es wurde gemischt:

A.	B.
50 ccm Molke	50 ccm Molke
20 > 25 % ige Invertzuckerlösung	20 > 25 % ige Invertzuckerlösg.
10 > 10 % Na ₂ HPO ₄	10 > 10 % Na ₂ HPO ₄
10 > Aq. dest.	10 > Na-Lactatlösg. (1 g Milchsäure enthaltend)
Die Lösungen wurden sterilisiert. Zusatz von	
10 > einer Reinkultur v. Streptococcus lacticus in Milch	10 > einer Reinkultur v. Streptococcus lacticus in Milch
100 ccm	100 ccm
+ 1,9 ccm 2 n-NaOH	+ 2,2 ccm NaOH (bis auf schwache Phenolphthaleinröte). p _H = 8,2.

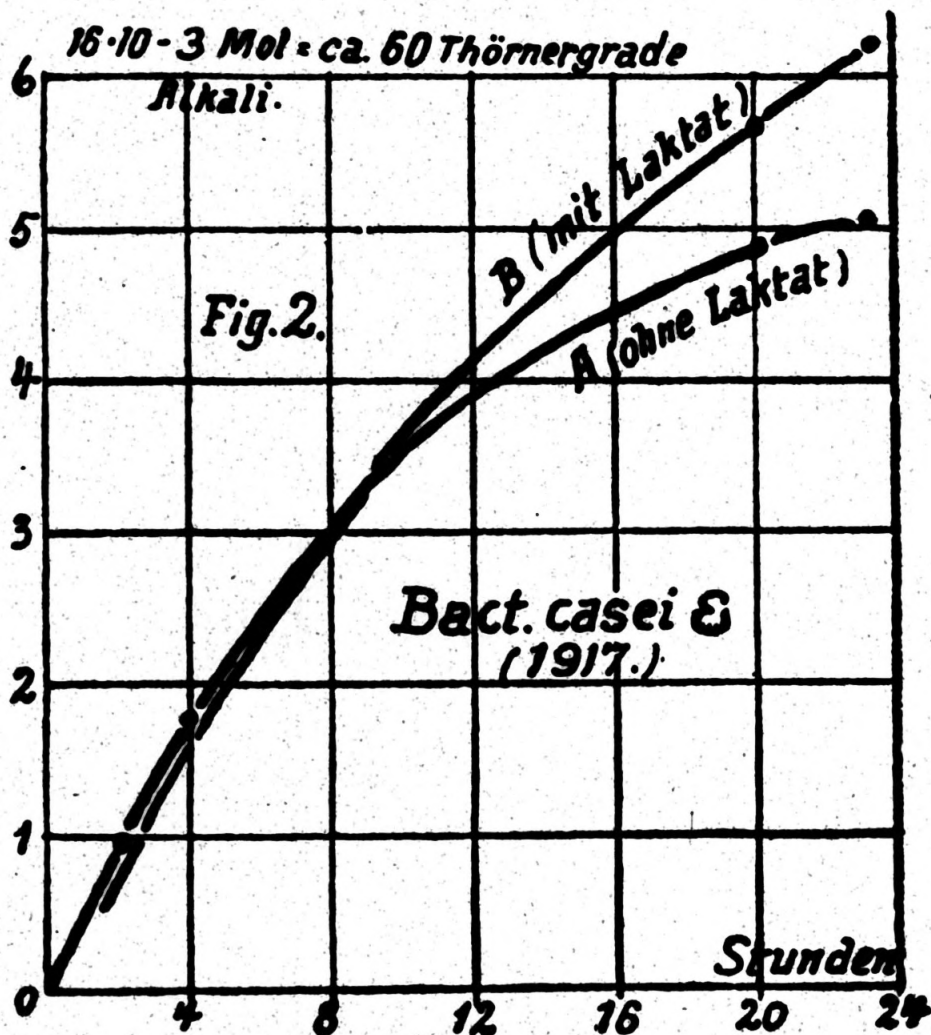
Die Kolben wurden steril verschlossen und im Wasserthermostaten von + 28° untergebracht. Von Zeit zu Zeit wurden Proben auf je 10 ccm mit 0,216 n-NaOH gegen Phenolphthalein titriert. Die schließlichen p_H-Werte wurden elektrometrisch bestimmt.

Zeit, Tage	Titrationsacidität in Thörner-Graden	
	A	B
0	0	0
1	21,5	4,5
2	76	56
3	84	69
4	89	76
6	91	81
Schließlich p _H	4,11	4,35 (Maxim. bei 18° 3,9—4,0.)

¹⁾ Euler und Svanberg, Diese Zeitschr., Bd. 100, S. 157 (1917).



Die Titrationsresultate der früheren Mitteilung sind in Figur 2 graphisch dargestellt.



Die p_H -Werte bei diesen Versuchen betragen in

	A ohne Lactat	B mit Lactat
nach 23 Stunden	3,4	3,7

Das maximale p_H der Lactobacillen betrug bei 11 verschiedenen, von Barthel und von Svanberg untersuchten Stämmen 2,7 bis 3,0 bei 37—43°.

Die in den Figuren 1 und 2 dargestellten Versuche lassen sich, wie besonders betont werden soll, nicht ohne weiteres vergleichen. Abgesehen davon, daß sich Fig. 1 auf *Streptococcus lactis*, dagegen Fig. 2 auf *Bact. casei* ϵ bezieht, haben die in Fig. 1 dargestellten Gärungen mit einer Acidität von $p_H = 8,2$ begonnen, also in einer Lösung, welche alkalischer war, als dem p_H -Optimum entspricht. Bei den Versuchen Fig. 2 entsprach hingegen die Ausgangslösung einem p_H -Wert von 5–6, war also ausgesprochen sauer.

Zusammenfassung.

Es wurden an *Streptococcus lactis* neue Messungen angestellt.

1. Phosphat hemmte die Entwicklung (den Zellenzuwachs) unseres Bakterienstammes in saurer, weniger in neutraler Lösung.

2. Das Maximum der Säuerung betrug bei Zimmertemperatur $p_H = 3,9$ bis 4,0.

3. Bei den Lactobazillen beträgt die maximale Acidität (berechnet nach 11 von Barthel und von Svanberg untersuchten Stämmen) $p_H = 2,7$ bis 3,0 bei einer Temperatur von 37° – 43° .

4. Eine Entwicklung von CO_2 wurde durch unseren Stamm in keinem Fall beobachtet und dürfte bei den früheren Versuchen durch Infektion mit anderen Mikroorganismen veranlaßt gewesen sein.

5. Bezüglich des Einflusses von Lactat ergab eine neue Versuchsreihe Hemmung der Milchsäurebildung bei einer Anfangsalkalinität entsprechend $p_H = 8,2$. Die Lactatwirkung ist, wie zu erwarten, von der Acidität der Lösung abhängig.

Nachtrag bei der Korrektur.

In einer soeben erschienenen Abhandlung von W. van Dam, Hoorn (Biochem. Zeitschr. 87, 107, 1918) «Über den Einfluß der Milchsäure auf die Milchsäuregärung» berichtet der Verfasser über Versuche mit Milchsäure-Streptococcen der holländischen Käsefabrikation, deren Resultate mit den unsrigen

durchaus im Einklang stehen. Von den Versuchsergebnissen van Dams sei besonders hervorgehoben:

1. Der fatale Wasserstoffionenexponent beträgt bei einer Versuchstemperatur von $+ 22^{\circ}$ $p_H = 4,0$.

2. Durch Zusatz von Natriumlactat bleibt die Wasserstoffionenkonzentrationen der Gärflüssigkeit auf Werten stehen, die kleiner sind als die maximalen, und zwar um so kleiner, je mehr Lactat zugesetzt wurde. Die Tabelle II des Verf. (Seite 109) haben wir auf die entsprechenden p_H -Werte umgerechnet und geben folgenden Auszug:

Tab. II.

ccm norm. Na-Lactat zu 90 ccm Molke	Pot. Säuregrad vor dem Brüten	Pot. Säuregrad nach dem Brüten	p_H nach dem Brüten
10	8,9 NaOH 0,1 n.	30,0	4,75
8	8,9 „	31,2	4,65
6	8,9 „	32,4	4,55
4	8,9 „	33,2	4,45
2	8,9 „	34,4	4,30
0	8,9 „	37,2	4,05

Nicht zum wenigsten bemerkenswert ist die kritische Deutung, welche der Verf. seinen Versuchsergebnissen anschließt, die bei oberflächlicher Betrachtung gegen die wesentliche Bedeutung der Wasserstoffionen zu sprechen scheinen, und welche durch die hemmende Wirkung der undissoziierten Milchsäuremoleküle ihre Erklärung finden.

Es treten also bei der Milchsäuregärung ähnliche Erscheinungen hinsichtlich der Säurewirkung zutage, wie bei der Hefegärung, wo sich ebenfalls die Wirkung der H-Ionen und der undissoziierten Moleküle superponiert.¹⁾

¹⁾ Vgl. hierzu z. B. Johannesson, Biochem. Zeitschr. Bd. 47, S. 97 (1912). — Hägglund, Samml. chem. u. chem. techn. Vorträge 1914.