

Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs- und Genußmittel, sowie der Gebrauchsgegenstände.

Heft 4.

15. August 1916.

Band 32.

Über Bakterienprotease in der Milch.

Von

L. Swiatopelk-Zawadzki.

Mitteilung aus dem Chemisch-Bakteriologischen Laboratorium in Warschau;
Leiter: Dr. Serkowski.

(Vorgelegt am 8. Juni 1916 der Warschauer Gesellschaft der Wissenschaften.)

[Eingegangen am 19. Juni 1916.]

In das bis unlängst noch völlig in Dunkel gehüllte Gebiet der kollektiven Verdauungsstörungen sind letzthin zwei Richtungslinien eingeführt worden, einerseits die atoxische Vitaminentheorie von Casimir Funk¹⁾, und andererseits die peptotoxische Theorie von Besredka²⁾; diese beiden Theorien bilden die Grundlage zahlreicher Forschungen. Die erste Theorie berücksichtigt die Abwesenheit gewisser Stickstoffbasen, wie z. B. in den polierten Getreidekörnern, Reis u. dgl.: die zweite dagegen zieht die Bildung von toxischen Produkten in Peptonnährböden unter der Wirkung von peptonisierenden, an und für sich nicht virulenten Bakterien in Erwägung. Allgemein bekannt sind die zahlreichen Beobachtungen über Kollektivvergiftungen durch Fleisch, welches den *Bacillus peptonificans* von der Gruppe der Flügge'schen peptonisierenden Bakterien oder den *Bacillus prodigiosus* (Befund von Parkes) oder endlich den *Bacillus faecalis alcaligenes* (Ridder) enthält. Dergleichen Vergiftungen werden von akuten Verdauungsstörungen mit häufigem Todesausgange begleitet³⁾.

Ich verzichte hier auf die Anführung der Literatur über die Bedeutung der peptonisierenden Bakterien in der Milch, Befunde, die seit den Forschungen von Flügge und Escherich wohl bekannt sind, und erwähne nur, daß die bakterielle Theorie in den letzten Jahren infolge des Mangels an direkten, zu ihren Gunsten sprechenden Befunden vielleicht etwas an ihrer Schärfe verloren haben mag, obwohl auch andererseits keine Gegenbeweise vorgebracht worden sind; die endotoxische Theorie der Säuglingssterblichkeit im Sommer wird von Heubner, Lieffmann und Rietschel als eine Hypothese ohne experimentelle Grundlage angesprochen. Neue Befunde wurden von Hanssen⁴⁾ mitgeteilt, welcher die Wirkung von infizierter Milch auf Magen und Darmkanal untersuchte und bei Hunden akute Verdauungsstörungen herbeiführte, indem er sie mit einer peptonisierende Flügge'sche Bakterien enthaltenden Milch

¹⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1913, 88, 352 und eine Reihe von Arbeiten über Vitamine; die letzten in Zeitschr. physiol. Chem. 1914, 89, 473 u. 378.

²⁾ A. Besredka, H. Ströbel und J. Jupille in Compt. rend. Soc. de Biol. 1911, 71, 691.

³⁾ St. Serkowski und Tomczak in dieser Zeitschr. 1911, 21, 211.

⁴⁾ Zentralbl. f. Bakteriologie I, 1912, 62, 89.

fütterte. Auf der Schädlichkeit der Milch mit bakteriellen Pepto-Endotoxinen vieler Aerobier und Anaerobier begründete St. Serkowski¹⁾ zwei Methoden und führte sie bei den sanitären Milchanalysen ein, und zwar die Pepton- und die Metacaseinprobe. Zuletzt sind noch zu erwähnen die pyretogenischen Erscheinungen unter der Wirkung von Milchcasein [Holt und Livené²⁾], denen Milchserum angeblich vorbeugen soll, sowie auch die Bedeutung der peptonisierenden Bakterien im Darm bei Eiweißabbau [D. M. Bertran³⁾].

Die Untersuchungsreihe über Bakterienprotease in der Milch habe ich mit Versuchen eingeleitet, welche zu ermitteln bezweckten, ob frische normale Milch an und für sich kein Pepton enthält und ob in frischer steriler Milch unter der Wirkung von proteolytischen bakterienlosen Enzymen nicht Peptonbildung stattfinden könnte, gleichwie in der sogenannten Autolyse der Gewebe [C. Oppenheimer⁴⁾]. Das Resultat der mannigfaltigen einschlägigen Forschungen, sowie die Kontrollen der untenstehend vorgeführten lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

Frische sterile Milch (37° C) enthält kein Pepton (Untersuchung auf Pepton von 6 Stunden bis 7 Tage).

In Milch mit peptonisierenden Bakterien tritt Pepton auf (Untersuchung auf Pepton von 6 bis 72 Stunden).

(Die Geschwindigkeit des Auftretens von Pepton wird durch die Temperatur und durch den Stamm und die Art der Bakterien bedingt.)

Eines der wichtigsten methodischen Momente ist die sorgfältigste Trennung des Milchserums von den Eiweißkörpern, worauf Serkowski in seiner Arbeit⁵⁾ bereits aufmerksam macht. Anfänglich habe ich das Milchserum aus der Milch unter Zugabe von Essigsäure durch nachheriges Kochen getrennt, indem ich dabei einen Überschuß dieser Säure zu vermeiden suchte, der eine Bildung von löslichen Albuminaten herbeiführen könnte. Nach Abkühlung nahm ich eine mehrfache Filtration vor, bis eine ganz klare Flüssigkeit erhalten wurde. In den seltenen Fällen, wo sogar eine dreifache Filtration ungenügend war, schüttelte ich die Milch mit Talk durch und sättigte sie mit Kochsalz. Bei meinen weiteren Versuchen bediente ich mich zur Trennung des Milchserums der Methode für das „Tetraserum II“ [Tetrachlorkohlenstoff-Essigsäureserum II, nach B. Pfyl und R. Turnau⁶⁾]. Die Methode des Tetraserums II erwies sich als bequemer und zuverlässiger als die vorgenannte. Nachdem ich ein klares, eiweißloses Milchserum erhalten hatte, trat ich auf dem üblichen Wege an die Biuretreaktion⁷⁾. Sofern sich dabei ein Sediment bildete, welches die eigentliche Färbung verbarg, habe ich es durch Zentrifugieren beseitigt. Die Stärke der bei der Biuretreaktion erhaltenen Färbung steht in einem direkten Verhältnis zum Peptongehalt. Nach dem Vorschlage von Fuhrmann⁸⁾ habe ich die Stärke der Färbung

¹⁾ Deutsche mediz. Wochenschr. 1916 und Zdrowie 1916, **32**, 139.

²⁾ Mediz. Klinik 1913, **7**, 258 (Rockefeller Institut).

³⁾ Ann. de l'Inst. Pasteur 1913, Januar, 76 (Laboratorium von Metchnikoff).

⁴⁾ Carl Oppenheimer, Stoffwechselermente. Braunschweig 1915, 39.

⁵⁾ Zdrowie S. 152.

⁶⁾ Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte 1912, **40**, 245.

⁷⁾ Die für vergleichende Proben, besonders aber für spektrophotometrische Bezeichnungen angewandte Methode war die folgende: 5 ccm Milchwasser + 1 ccm 1%-iger Kupfersulfat-Lösung + 2 ccm 10%-iger Natronlauge.

⁸⁾ Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme. 1907.

bei der Biuretreaktion mittels des Schmidt-Haensch'schen Spektrophotometers bestimmt. So z. B.

Biuretreaktion	Spektrophotometer	Diese Zahlen ergänzen die Spektrophotometergrade zu 90°.
+	29,9 ⁰	
+	32,0 ⁰	
+	34,5 ⁰	
+	34,6 ⁰	
++	35,0 ⁰	
++	38,1 ⁰	
++	39,0 ⁰	
++	39,8 ⁰ (24 Stdn. später 42,1 ⁰)	
++	39,9 ⁰	
++	41,1 ⁰	
++	41,2 ⁰	
++	45,1 ⁰	

Im Zusammenhange mit der während der Sommerhitze zunehmenden Sterblichkeit der Säuglinge ist eine im Sommer anwachsende Virulenz der Gärungsbakterien festgestellt worden (Scholl und Schierbeck). In Escherich's Versuchen vom Jahre 1889 war ein mit einer im Thermostaten (37° C) gehaltenen Milch gefütterter Hund unter Erscheinungen von akuter Diarrhöe verendet, während ein zweiter Hund die gleiche, bei niedrigerer Temperatur gehaltene Milch ohne jeglichen Schaden vertragen hat. Nach Cnopf wächst die Bakterienzahl in einer im Brutschrank gehaltenen Milch im Laufe von 4 Stunden auf das 215-fache an, während sie in einer im Keller aufbewahrten Milch nur auf das 8-fache ansteigt.

Der Vergleich von Peptonproben in einer bei 37° C und bei Zimmertemperatur (Versuchszeiten vom 17.—24. Mai 1916) gehaltenen Milch in bezug auf die Inkubationsperiode lieferte die nachstehenden Ergebnisse. Die Versuchsreihe umfaßt 21 Ladenmilchproben und 11 Proben von Warschauer Märkten und vorstädtischen Kuhställen.

Tabelle I.

Milch No.	Zeit des Eintretens der Peptonreaktion					Milch, gehalten bei 12° C
	Bei der Ein- lieferung	Milch, gehalten bei 37° C				
		nach 12 Stdn.	nach 24 Stdn.	nach 48 Stdn.	nach 72 Stdn.	
1	—	—	+			nicht untersucht
2	—	—	+			" "
3	—	—	—	+		" "
4	—	—	+			" "
5	+					" "
6	—	—	—	+		" "
7	—	—	Spur	+		nach 5 Tagen
8	—	—	—	+		" 5 "
9	—	—	—	+		" 5 "
10	—	—	+			" 5 "
11	—	—	—	—	+	" 6 "

Milch No.	Zeit des Eintretens der Peptonreaktion					Milch, gehalten bei 12° C
	Bei der Ein- lieferung	Milch, gehalten bei 37° C				
		nach 12 Stdn.	nach 24 Stdn.	nach 48 Stdn.	nach 72 Stdn.	
12	—	—	—	+		„ 5 „
13	—	—	Spur	+		„ 5 „
14	—	—	—	+		„ 5 „
15	—	—	—	+		„ 5 „
16	—	—	—	+		„ 5 „
17	—	—	—	+		„ 5 „
18	—	—	—	+		nicht untersucht
19	—	—	—	—	+	„ „
20	+					„ „
21	—	—	—	+		nach 5 Tagen
22	—	—	+			nicht untersucht
23	—	—	—	+		„ „
24	—	—	—	—	+	„ „
25	—	—	—	—	+	nach 7 Tagen
26	+					nicht untersucht
27	—	—	+			„ „
28	+					„ „
29	—	—	—	+		„ „
30	—	—	+			„ „
31	—	—	—	+		„ „
32	—	—	+			„ „

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß Pepton in der Milch meistens (50 % der Fälle) nach 48 Stunden (37° C) nachgewiesen werden konnte. Nur in 4 Fällen (No. 11, 19, 24, 25) hat die Peptonprobe erst nach 72 Stunden positive Reaktionen gegeben. Die Fälle, wo Pepton bereits nach 24 Stunden aufgetreten war, betragen etwa 40 %.

Ferner ist zu ersehen, daß eine den Milchläden, den Warschauer Märkten und den vorstädtischen Kuhställen entnommene Milch stets peptonisierende Bakterien enthielt, nur ist die Zeit des Auftretens von Pepton eine verschiedene. Mit anderen Worten, keine dieser Proben eignete sich als Säuglingsmilch, oder wenigstens (angesichts des völligen Mangels an sogenannter Säuglingsmilch in Warschau) keine derjenigen, in denen Pepton sofort oder auch nach 24 Stunden nachweisbar war (37° C).

Die obige Tabelle zeigt ferner, daß die bei einer Temperatur von nicht über 12° C gehaltene Milch gewöhnlich erst am 6., 7. oder 8. Tage eine Peptonisierung erleidet, also nach abgelaufenem Koagulationsprozeß. Je länger eine Milch der hydrolytischen Wirkung von Bakterienprotease im Brutschrank (37° C) widersteht, desto später wird sie einer Peptonisierung auch bei niedrigerer Temperatur unterliegen (vergl. No. 7 und 25).

Die Eiweißspaltung (Hydrolyse) erfolgt unter der Wirkung von hydrolytischen Fermenten (Hydrolasen), unter denen die proteolytischen Fermente oder die sogenannten Proteasen von erster Bedeutung sind. Zahlreiche weiter unten besprochene Bakterienarten besitzen ein Proteasebildungsvermögen; es sind dies die Bak-

terienproteasen. Bis jetzt sind diese noch ungenügend erforscht worden; so ist es z. B. unbekannt, ob die unter der Proteasewirkung von Aerobiern oder Anaerobiern in Fleisch, Fischen und Milch entstehenden Produkte an und für sich für den Organismus schädlich sind oder aber ob diese Zerfallsprodukte erst zum Agens werden, welches die Bildung von Peptotoxinen herbeiführt. Es gibt recht viele Befunde, die darauf hinweisen, daß sogar die als nichtpathogen erkannten Bakterien von schädlicher Wirkung auf den Organismus werden können, wenn sie gleichzeitig auch proteolytische Eigenschaften besitzen. Bei Fleisch und Fischen pflegt es zuweilen vorzukommen (Jeserich und Niemann), daß sie in einem weit fortgeschrittenen Fäulnisstadium unschädlich werden, wogegen sie noch wenig verändert, also im Anfangsstadium des Zerfalls, ohne äußere Fäulniszeichen giftige Eigenschaften zeigen können. Hübener¹⁾ führt eine Statistik solcher Vergiftungen an. Das gleiche ließe sich sagen über Massenvergiftungen nach dem Genuß von Kartoffeln, Erscheinungen, die früher auf Solanin und Solanidin zurückgeführt wurden, jedoch seit den Forschungen von Dieudonné und Haselberg eher den Zerfallsprodukten unter der Wirkung von Bakterien, besonders derjenigen von der *Proteus*-Gruppe, zugeschrieben werden.

Die Anwesenheit von Protease gibt sich in der Verflüssigung von Gelatine durch Bakterienkolonien kund; jedoch schließt mangelndes Verflüssigungsvermögen die Anwesenheit von proteolytischem Enzym keineswegs aus²⁾. Demnach sind nach Hahn und Geret³⁾ zwei Gruppen von proteolytischen Enzymen zu unterscheiden: Ekto- und Endoenzyme. Die ersteren stellen ein Sekretionsprodukt dar, die letzteren sind dagegen mit der Zelle unzertrennbar verbunden (ähnlich wie Endotoxine). Außer Gelatine können als Reagenzien auf Proteasen gebraucht werden: Fibrin, Alkali-Albuminate (erhalten durch Mischen von Eiereiweiß oder Blutserum mit Alkali-ammoniak, 20 0/0-iger Natriumcarbonatlösung und nachheriges Erhitzen auf 70° C), weiter erstarrtes Serum (Loeffler'scher Nährboden), Hühnereiereiweiß und endlich Casein.

Dank einer größeren Widerstandsfähigkeit der Enzyme gegen äußere Einflüsse, im Vergleich zu derjenigen der Bakterienzellen selbst, ist es mehrfach gelungen, die einen von den anderen zu trennen, sei es durch Erhitzen auf 60° C (Bitter), durch Desinfektionsmittel, wie Thymol, Toluol, Carbolsäure oder endlich vermittelt hohen Druckes (300 Atmosphären. — Hahn und Geret).

Zunächst wurde allgemein angenommen, daß die peptonisierenden Bakterien (welche stets durch ihre proteolytischen Enzyme einwirken) das ihrer Wirkung ausgesetzte Eiweiß anfänglich durch Säurebildung gerinnen lassen, und erst nach Ablauf dieses Vorganges das geronnene Eiweiß nachträglich hydrolysieren, indem sie Pepton bilden. Doch lassen die letzten Beobachtungen von St. Serkowski⁴⁾ annehmen, daß diese beiden Prozesse, und zwar Caseinkoagulation und die nachherige Peptonisierung voneinander höchst unabhängig und auf andere Umstände zurückzuführen sind. Nach dieser Ansicht kann die Peptonbildung in der Milch früher einsetzen, als Caseinflocken gefällt werden (Paracasein), und zwar schon dann, wenn noch die feinen

¹⁾ E. Hübner, Fleischvergiftungen. Jena 1910, S. 7.

²⁾ F. Fuhrmann, Vorlesungen über Bakterienenzyme. 1907.

³⁾ Zeitschr. physiol. Chem. 1901, **33**, 385.

⁴⁾ Zdzowie 1916, **32**, 152.

Metacaseinflöckchen, besonders nach dem Aufkochen, einzig mit Hilfe der sogenannten Metacaseinprobe nachweisbar sind.

Was nun die Frage betrifft, welche Bakterienarten gegenüber Eiweiß proteolysierendes Vermögen zeigen, so verfügen wir nur über Befunde und Beobachtungen, die weder systematisch geordnet, noch zu einem Ganzen zusammengefaßt sind. Taylor untersuchte die Abbauprodukte des Caseins unter der Wirkung von Coli- und Proteusbacillen; die ersteren vermochten das Casein nur schwach bis zu Pepton zu spalten, die letzteren dagegen spalteten es sehr energisch bis auf Histidin und Lysin.

Aus den Forschungen von Kalischer¹⁾ geht hervor, daß bei proteolytischer Caseinspaltung unter der Wirkung von Aerobiern kein Indol, Skatol, Phenol oder Kresol erzeugt wird. Die Bildung jener Produkte bei Fäulnisvorgängen ist auf sekundäre Nebenerscheinungen zurückzuführen. Gestützt auf seine Untersuchungen über die in Gelatine gezüchteten Bakterien zählt Fuhrmann zu den proteolytische Enzyme erzeugenden Bakterien folgende Arten: *Bacillus subtilis*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus prodigiosus* und *Staphylococcus pyogenes aureus*; die zwei letzten Bakterienarten werden unter dem Einfluß von äußeren Einwirkungen, wie Erwärmen usw. ihres proteolytischen Vermögens sehr leicht beraubt; dabei identifiziert der Verfasser, übrigen in Übereinstimmung mit C. Eijkmann²⁾, die Caseasen von Duclaux mit den Bakterienproteasen. Doch macht Fuhrmann darauf aufmerksam, daß es überhaupt unzulässig ist, die Bakterienproteasen zu identifizieren; so gibt es Arten, welche Gelatine verflüssigen, jedoch Fibrin und Casein nicht zu lösen vermögen, wogegen wieder andere Casein lösen und Gelatine nicht verflüssigen, wie z. B. *Bacillus coli communis*. Auch Fermi und Javillier³⁾ schließen sich dieser Ansicht an. Flügge⁴⁾, der die Bezeichnung „peptonisierende“ Bakterien einführte, hat 3 Anaerobier- und 12 Aerobierarten jener als Flügge'sche Bakterien bekannten Arten isoliert. Andere Forscher rechnen zu derselben Gruppe von peptonisierenden Bakterien auch die Anaerobier *Paraplectrum foetidum* und die Gruppe des *Clostridium foetidum* hinzu. Hierher gehören auch: *Bacillus fluorescens liquefaciens* (R. Warrington)⁵⁾, *Bacillus mesentericus vulgatus* (Vignal)⁶⁾, *Vibrio cholerae asiaticae*, wie B. Czaplicki⁷⁾ nachgewiesen hat, sowie auch zahlreiche andere Aerobier und Anaerobier, mit und ohne Sporen, pathogene und Saprophyten. Marcelli Nencki hat das Verdienst, den Zusammenhang zwischen dem Faulen und dem Abbau von Proteinverbindungen nachgewiesen, sowie auch die Bedeutung der Anaerobier in dieser Erscheinung hervorgehoben zu haben. Nach H. Tissier⁸⁾ sind zwei Bakteriengruppen zu unterscheiden; die einen von ihnen vermögen nur die milchsäure Gärung herbeizuführen (*Bacillus acidi paralactici*, *Bacillus coli communis*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *Bacillus butyricus*), wogegen die anderen wieder Casein spalten und peptonisieren (*Bacillus mesentericus*,

¹⁾ Arch. f. Hygiene 1900, 37, 30—53.

²⁾ Zentralbl. f. Bakteriologie. I. Abt. 1901, 29, 841.

³⁾ Bullet. Sciences Pharmacol. 1903, 5, 153.

⁴⁾ Zeitschr. f. Hygiene u. Infekt. 1894, 17, 288.

⁵⁾ The Lancet 1888, 1, 25.

⁶⁾ Zentralbl. f. Bakteriologie. I. Abt. 1890, 7, 61.

⁷⁾ B. Czaplicki (aus dem Laboratorium von Dr. Serkowski), Methoden zur Homogenisation der Milch als Nährboden für Bakterien. Milch-Ztg. 1905.

⁸⁾ Annales de l'Institut. Pasteur 1903, 8, 540.

Bacillus subtilis, *Bacillus putrificus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus faecalis alcaligenes*). Doch sind weder die einen noch die anderen imstande, Milcfäulnis zu bewirken, woran sich vorwiegend die Spaltpilze *Oidium lactis* und andere beteiligen. Somit stimmt Tissier in diesem letzten Punkte mit Kalischer völlig überein.

Bei sämtlichen der angeführten Verfasser fehlen Angaben darüber, wie schnell und unter welchen Umständen (Temperatur) die untersuchte proteolytische Bakterienart ihre Spaltwirkung dem Eiweiß gegenüber ausüben kann. Um diese Frage zu erörtern, habe ich eine Reihe in untenstehenden Tabellen zusammengefaßter Untersuchungen vorgenommen, sowohl mit allgemein zu den proteolisierenden gerechneten Bakterienarten, wie auch mit solchen, über welche die Ansichten bis jetzt noch geteilt sind. Bei diesen Untersuchungen habe ich eine mit in Agar gezüchteten Bakterien geimpfte Milch benutzt. Zur Impfung bediente ich mich einer unverdünnten, im Autoklaven sterilisierten peptonfreien Milch, die in Proberöhrchen zu je 10 ccm verteilt wurde. Jedes Röhrchen wurde mit möglichst gleicher Menge Bakterien geimpft. Die geimpften Röhrchen wurden samt den ungeimpften Kontrollröhrchen (Kontrolle über Sterilität und Abwesenheit von Autolyse) in den Brutschrank gestellt (37° C).

Tabelle II.
(Versuchstemperatur 37° C.)

No.	Bakterienart	Die Biuretreaktion trat ein nach							Spektrophotometrische Probe nach 48 Stdn.
		6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	36 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	
1	<i>B. acidi lactici</i> 1 . . .	—	—	—	—	—	—	— ³⁾	
2	" " " 2 . . .				—	—	—	— ³⁾	
3	" " " 3 . . .					—	—	— ³⁾	
4	" " " 4 . . .					—	—	— ³⁾	
5	" " " 5 . . .						—	— ³⁾	
6	<i>B. butyricus</i>	—	—	—	—	—	—		
7	<i>Clostridium foetidum</i> 1 .	—	—	—	Spur	+	++ ¹⁾		41,2°
8	" " " 2 .			—	+	++ ¹⁾			
9	Kontrolle . . .			—	—	—	—	— ²⁾	
10	<i>B. coli commune</i> 1 . .	—	—	—	—		++		45,1°
11	" " " 2 . .			—	—		++		
12	" " " 3 . .				—	+			
13	" " " 4 . .			—	+				
14	" " " 5 . .	—	—		+				
15	<i>B. cyanogenes</i> 1 . . .				—	—		++	
16	" " " 2 . . .						+		
17	" " " 3 . . .					—			
18	" " " 4 . . .		—		—				
19	Kontrolle . . .				—	—	—	—	
20	<i>B. lactis Adametz</i> . .		—	—	+				
21	<i>B. mesentericus vulg.</i> 1		—		+		++		35,0°
22	" " " 2 .			—	+		++		39,0°

¹⁾ Metacaseinprobe positiv.

²⁾ Biuretreaktion nach 6 Tagen (bei No. 9) bzw. nach 7 Tagen (No. 19 und 44) noch negativ.

³⁾ Biuretreaktion bei No. 1 und 2 nach 5 Tagen bei No. 3 und 4 nach 6 Tagen und bei No. 5 nach 7 Tagen noch negativ.

No.	Bakterienart	Die Biuretreaktion trat ein nach							Spektropho- tometrische Probe nach 48 Stdn.
		6 Stdn.	12 Stdn.	18 Stdn.	24 Stdn.	36 Stdn.	48 Stdn.	72 Stdn.	
23	<i>B. mesentericus</i> vulg. 3		—	+					
24	" " " 4	—							
25	" " " 5	—							
26	<i>Microc. Freudenreich.</i> .				—		+		
27	<i>Paraplethr. foet.</i> 1 . .						+		
28	" " " 2 . .		—	—	+				
29	" " " 3 . .			Spur	+	++	+++ ¹⁾		39,9°
30	" " " 4 . .			+	++		++		42,1° ³⁾
31	" " " 5 . .		+ ¹⁾	+++ ¹⁾					
32	" " " 6 . .	—							
33	<i>B. paratyphi</i> B . . .			—	—	—			
34	Kontrolle		—	—	—	—	—		
35	<i>Pneumococci</i>					—		—	
36	<i>B. prodigiosus</i> 1 . . .						++		38,1°
37	" " " 2 . . .		Spur	+	++				
38	" " " 3 . . .	—			+				
39	<i>B. pyocyaneus</i> 1 . . .		—				+		29,9°
40	" " " 2 . . .					+	++		32,0°
41	" " " 3 . . .		Spur	+	++				
42	" " " 4 . . .	+ ¹⁾							
43	" " " 5 . . .	+ ¹⁾							
44	Kontrolle	—	—	—	—	—	—	— ²⁾	
45	<i>Staphyloc. aureus</i> 1 . .						+		
46	" " " 2 . . .				—		—		
47	" " " 3 . . .	—					—		
48	" " " 4 . . .	—						—	
49	<i>B. subtilis</i> 1			—			+		34,5°
50	" " " 2				—	—	+	++	40,0° ⁴⁾
51	" " " 3						+		34,6°
52	" " " 4				+				
53	" " " 5	+							
54	Kontrolle	—			—		—	—	
55	<i>B. typhi abdominalis</i> .			—	—	—			
56	Bakterien aus faulem Fleisch				+				
57	Bakterien aus faulem Käse				+				

1) Metacaseinprobe positiv.

2) Biuretreaktion nach 7 Tagen noch negativ.

3) Nach 24 Stunden 39,8°.

4) Nach 72 Stunden.

Um zu ermitteln, ob die Peptonisierung der Milch durch eine Symbiose der peptonisierenden Stämme beeinflusst werden könnte, führte ich die folgenden Versuche aus, bei denen ich zum Ausgangspunkte die am stärksten peptonisierenden Arten, zu-

sammen mit dem Aerobier *Bacillus acidi lactici* oder dem Anaerobier *Paraplectrum foetidum* (der gleichfalls stark peptonisiert) wählte.

Tabelle III (37° C).

Versuch No.	Bakterienarten	Die Biuretreaktion trat ein nach:			
		12 Std.	24 Std.	36 Std.	48 Std.
1	Bacillus acidi lactici +	—	—	—	+
2		—	—	Spur	+
3		—	—	—	Spur
4		—	+	++	
5	Kontrolle	—	—	—	—
6	Paraplectrum foetidum +	—	+		
7		—	Spur	+	
8		+ ¹⁾	++		
9		Spur	+		++
10		—	—	+	++ ²⁾
11	Kontrolle	—	—	—	—

Außer der Eintrittszeit der Biuretreaktion in einer mit heterogenen Bakterienarten geimpften Milch sind in den Tabellen II und III noch besonders diejenigen Fälle angeführt, in denen ich in einer nicht geronnenen und die obenerwähnte positive Metacaseinreaktion gebenden Milch Pepton nachgewiesen habe.

Gestützt auf sämtliche ausgeführten Untersuchungen und Beobachtungen halte ich die folgenden Schlüsse für gerechtfertigt:

1. Frische reine Milch ist peptonfrei. Dieser Befund ist durch meine eigenen Beobachtungen bestätigt worden, die mit den Ansichten von Teichert³⁾, Grimmer⁴⁾ und Serkowski⁵⁾ übereinstimmen.

2. Die Milchsäurebakterien in engerem Sinne lösen nicht Casein während der Untersuchungszeit (bis 7 Tage), was zu bedeuten hat, daß sie weder Protease enthalten, noch solche produzieren (Tabelle III).

3. Der Peptonnachweis in spontan geronnener Milch kann nur durch die Anwesenheit von peptonisierenden Bakterien erklärt werden.

4. Der Abbau von Casein und anderen Eiweißkörpern geht unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen nicht spontan, ohne Bakterienbeteiligung, vor sich (Tabelle II und III, Kontrolle).

5. Die Geschwindigkeit der Peptonbildung aus Eiweißkörpern unter dem Einfluß von Bakterienprotease steht in einem geraden Verhältnis zur Temperatur (Tabelle I) bis 44° C.

6. Proteolytische Fermente können sowohl durch Bakterien ohne Sporen, wie auch durch Sporenbildner, durch Aerobier und Anaerobier erzeugt werden. In den

¹⁾ Metacaseinprobe positiv.

²⁾ Spektrophotometrisch nach 48 Stunden 41,1°.

³⁾ Teichert, Methoden zur Untersuchung der Milch. 1909, S. 23.

⁴⁾ Grimmer, Chemie und Physiologie der Milch. 1910, S. 138.

⁵⁾ Serkowski, Zdrowie 1916, 32, 152.

Versuchen der Tabelle II wirkten von den Aerobiern am stärksten: *Bacillus pyocyaneus* (nach 6 Stunden); *Bacillus prodigiosus* (nach 18 Stunden) und *Bacterium coli commune* (nach 24 Stunden). Von den Sporenbildnern: *Bacillus subtilis* (nach 6 Stunden) und *Bacillus mesentericus vulgatus* (nach 18 Stunden); von den untersuchten anaeroben Sporenbildnern: *Paraplectrum foetidum* (nach 12 Stunden).

7. Die Geschwindigkeit und die Menge des durch Bakterien erzeugten Peptons schwanken für eine jede Bakterienart (Tabelle II, spektrophotometrische Angaben). Sie hängen ab von der Bakterienmenge und von den individuellen Merkmalen des untersuchten Stammes, die für eine und dieselbe Art ungleich sein können (*Bacillus subtilis*).

8. Die Koagulation der Milch ist weder unentbehrlich für die Caseinhydrolyse, noch begünstigt sie diese (Tabelle III, Symbiose mit *Bacillus acidi lactici*). Dieser Befund wird durch den Befund von Serkowski bestätigt, daß in einer die positive Metacaseinreaktion zeigenden Milch infolge von Hydrolyse der Metacaseinflöckchen Peptonbildung stattfinden kann. Außer den in den Tabellen II und III angeführten Fällen habe ich noch eine ganze Reihe ähnlicher Beobachtungen bei der ins Laboratorium eingelieferten Milch von verschiedener, unbekannter Herkunft gemacht.

9. Die Symbiose der peptonisierenden Aerobier- und Anaerobierarten übt unter den Versuchsbedingungen (Tabelle III) keinen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Peptonbildung oder auf dessen Menge aus.

Bei Zimmertemperatur und etwas unterhalb derselben (im Mittel 12° C) wird die Wirkung der Bakterienprotease bedeutend verlangsamt. Unter diesen Umständen kann in steriler, mit den in Tabelle II angegebenen Bakterienarten geimpfter Milch bereits nach 8 Stunden (*Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus subtilis*) bis 14 Tagen (*Bacterium coli commune*, *Bacillus prodigiosus*, *Paraplectrum foetidum*, *Bacillus mesentericus vulgatus*) Pepton nachgewiesen werden, also später als in nichtsteriler Milch (Tabelle I). Die Symbiose mit *Bacillus acidi lactici* scheint auch unter diesen Umständen das Ergebnis nicht wesentlich zu beeinflussen.

Zuletzt noch einige Worte über die weiteren Produkte des Eiweißabbaues unter der proteolytischen Wirkung von „peptonisierenden“ Bakterien. Bei einer ganzen Reihe von Versuchen, die ich an einer mit verschiedenen, stark proteolysierenden Bakterienarten geimpften Milch vorgenommen habe [Proben auf Indol nach der Methode von Salkowski und auf Kreatinin mit dem Reagens von Weyl¹⁾], konnte in der Milch selbst nach 7 bis 10 Tagen (37° C) keine Spur von Peptonabbau festgestellt werden. Sämtliche zu den Versuchen benutzten Bakterienarten sind in bezug auf ihre proteolytische Wirkung dem Eiweiß gegenüber nur streng „peptonisierend“. Dieser Befund wird bestätigt durch die Angaben von Tissier und Kalischer, daß die weitere Spaltung von Eiweiß mit Erzeugung von Indol, Skatol, Phenol, Kresol, und überhaupt von Produkten des eigentlichen Fäulnisvorganges auf andere Umstände zurückzuführen sind.

¹⁾ Vergl. T. Germán in Zentralbl. f. Bakteriologie, I. Abt. 1912, 63, 545.