

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

De zuurgraad van melk en wei.

DOOR

Dr. W. VAN DAM.

(Ingezonden 29 October 1917.)

Wanneer men aan steriele melk een weinig van een reïncultuur van melkzuurbacteriën toevoegt en het mengsel bij een voor den groei dezer bacteriën geschikte temperatuur bewaart, dan vormt zich melkzuur, dat aanvankelijk grootendeels geneutraliseerd wordt door in de melk aanwezige verbindingen. Naarmate de melkzuurvorming voortschrijdt, wordt de melk zuurder en ten slotte verkrijgt ze een zòd hoogen zuurgraad, dat de bacteriëngroei er door belemmerd en de zuurproductie opgeheven wordt. Neemt men in plaats van melk, wei, die met melkzuurbacteriën geënt wordt, dan heeft de gisting een overeenkomstig verloop; er wordt echter in dit geval minder melkzuur per volume-eenheid geproduceerd, wegens de afwezigheid van verreweg het grootste deel der neutraliseerende kalkverbindingen, die in de wrongel terecht gekomen zijn. Evenals bij de melk houdt de zuurvorming ook in de wei ten slotte op. Dit alles is den zuivelbereider bekend. Welke beteekenis men hechten moet aan den door titreeren gevonden „zuurheidsgraad” van zulke zuur geworden melk en wei, bepaaldelijk ook met betrekking tot de schadelijke werking van beide media ten opzichte van bacteriën, is niet van algemeene bekendheid. Het feit toch, dat de zure melk steeds belangrijker meer loog ter neutralisatie ten opzichte van phenolphtaleïne vordert dan de zure wei, brengt menigeen tot de meening, dat de eerste dan ook zuurder is dan de laatste. Dit blijkt o. a. uit het volgende voorbeeld, waarin de beteekenis dezer kwestie duidelijk uitkomt, en dat mij aanleiding gegeven heeft tot het onderzoek, waarvan de uitkomsten hieronder zijn medegedeeld.

Door de Rijksseruminrichting werd, in verband met de vraag, in hoeverre de zure wei der kaasfabrieken schadelijk of doodend werkt op daarin voorkomende tuberkelbacillen, een onderzoek ingesteld naar den zuurheidsgraad van de wei, afkomstig van de kaasfabriek „de Ster” te Berkhout. Gedurende een jaar werd wekelijks een monster onderzocht met het resultaat, dat een tamelijk constante

zuurgraad van $\pm 20^\circ$ Soxhlet-Henkel ($\frac{1}{4}$ norm.) gevonden werd. De gedrukte notulen der Vergadering van de Vereeniging tot ontwikkeling van den Landbouw in Hollands Noorderkwartier, gehouden op 18 November 1914, vermelden de verkregen cijfers, onder de volgende bijvoeging.

„Uit de gegevens wordt geconcludeerd, dat de zuurheidsgraad der wei bij aankomst in het laboratorium nog vrij laag is en veel lager dan die van de melk, waarin zich tuberkelbacillen bevonden en welke alhier aan kalveren gevoederd werd. Deze melk had een zuurgraad van 38° — 40° . Uit dit onderzoek blijkt, dat de zuurgraad der wei niet zoo hoog is als werd aangenomen en dat in verband met de proeven aan de Rijksseruminrichting de tuberkelbacillen dus niet in deze zure wei gedood zullen worden.”

Hieruit blijkt dus, dat aan genoemd instituut de opvatting bestond, dat de melk, die 38° — 40° S.H. leverde bij de titratie, zuurder moest zijn dan de wei, die een zuurgraad van slechts $\pm 20^\circ$ S.H. vertoonde, en dat dus tuberkelbacillen, die in de zure melk niet gedood werden, in de zure wei nog minder kans op beschadiging zouden hebben.

In deze Verslagen is er reeds meermalen op gewezen, dat de door titreeren gevonden zuurgraad in de meeste gevallen geen aanwijzing geeft voor de mate van zuurheid van een vloeistof en dit is met name het geval waar wij met lichaamsvochten te doen hebben. Waar nu een instituut als het bovengenoemde op zijn door titreeren gevonden cijfers biochemische beschouwingen grondt, is het misschien niet overbodig een korte uiteenzetting te geven van hetgeen er plaats heeft, indien een stof als melk, met loog getitreerd wordt bij gebruik van phenolphtaleine als indicator, omdat daaruit het ongemotiveerde van de redeneering duidelijk blijkt.

Beschouwen wij eerst versche melk, waarin dus nog geen melkzuurgisting heeft plaats gehad. De reactie hiervan ten opzichte van lakmoes is amphoter, ten opzichte van phenolphtaleine is ze zuur, of juist uitgedrukt, niet alkalisch.

Om een zwakke roodkleuring van de phenolphtaleine te verkrijgen, blijkt per 100 c.c. een hoeveelheid $\frac{1}{10}$ n. loog noodig te zijn van 15 à 20 c.c. Hoe komt het nu, dat we aan 100 c.c. van een neutrale stof (ten opzichte van lakmoes) ± 20 c.c. $\frac{1}{10}$ n. loog kunnen toevoegen, alvorens phenolphtaleine rood te kleuren, terwijl voor dezelfde hoeveelheid van de eveneens neutrale stof water, waaraan phenolphtaleine is toegevoegd, slechts één druppeltje van dezelfde loog voldoende is om deze kleurverandering teweeg te brengen?

De indicator phenolphtaleine wordt eerst rood gekleurd, wanneer de concentratie der hydroxylionen bij gewone temperatuur $\pm 1 \times 10^{-5}$ normaal geworden is. In zuiver water is ze slechts 1×10^{-7} normaal en hierin zal de phenolphtaleine dus kleurloos blijven. Voegen we aan b.v. 100 c.c. water één druppel, d. i. 0,05 c.c., $\frac{1}{10}$ n. natronloog

toe, dan verkrijgen we een zeer verdunde Na OH oplossing, die 5×10^{-5} norm. is. Daar in een zoo verdunde oplossing het natriumhydroxyd practisch volledig gesplitst is, is het OH-ionengehalte der vloeistof ook 5×10^{-5} normaal, en zelfs iets hooger, als we met de OH-ionen van het water rekening houden. Door toevoeging van één druppel $\frac{1}{10}$ n. loog aan 100 c.c. water wordt het OH-ionengehalte dus meer dan $5 \times$ zoo groot als dat, hetwelk bereikt moest worden om de phenolphtaleine rood te kleuren.

Bij de melk is de zaak anders. Versche melk heeft een hydroxylionengehalte, dat slechts zeer weinig afwijkt van dat van zuiver water, het is *iets* kleiner. Om tot de concentratie 1×10^{-5} norm. te komen moet, zooals boven reeds werd gezegd, 15 à 20 c.c. $\frac{1}{10}$ n. loog toegevoegd worden. Pliikbaar worden dus de hydroxylionen, die in den vorm van Na OH oplossing worden toegevoegd, aanvankelijk weggenomen.

Welke bestanddeelen der melk dragen hiertoe bij?

In de eerste plaats het calciumcaseinaat ¹⁾, dat in de melk in verbinding met phosphorzuur in den bekenden opgezwollen toestand voorkomt. Deze caseine-kalk splitst nog in geringe mate waterstofionen af, reden waarom men ze *zuur* calciumcaseinaat heeft genoemd. Deze waterstofionen verbinden zich bij toevoeging van Na OH onmiddellijk met de OH-ionen tot watermoleculen, terwijl de dubbelverbinding Natrium—Calciumcaseinaat zich vormt.

De hydroxylionenconcentratie der melk neemt evenwel toch toe, want deze dubbelverbinding wordt door de overmaat water hydrolytisch gesplitst en bij voortzetting van de toevoeging van loog komt er een oogenblik, waarop de normaliteit $\pm 1 \times 10^{-5}$ bereikt wordt, die de phenolphtaleine van kleur doet veranderen. Echter niet alleen de caseine der melk speelt hier een rol. Dit blijkt al dadelijk hieruit, dat bij filtreren van de melk door een Chamberland-kaars het heldere, caseinevrije, filtraat zich evenzoo gedraagt ten opzichte van loog als de melk zelf; er blijkt alleen minder loog noodig te zijn om de phenolphtaleine te kleuren, maar ook het filtraat, het serum dus, blijkt stoffen te bevatten, die hydroxylionen vastleggen, want er is nog een belangrijk aantal c.c. $\frac{1}{10}$ n. loog noodig om 100 c.c. serum te neutraliseeren ten opzichte van phenolphtaleine. Tot deze stoffen behooren in de allereerste plaats de phosphaten. Evenals de melk zelf is het serum nagenoeg neutraal. Waar nu bekend is, dat de monophosphaten duidelijk zuur, de biphosphaten daarentegen alkalisch reageeren, kan aangenomen worden, dat in het serum een mengsel van beide zal voorkomen. Wat geschiedt er nu, als aan dit mengsel loog toegevoegd wordt? Om dit goed in te zien kunnen we gebruik maken van de uitkomsten van een onderzoek, dat met

¹⁾ Hiermede is niet bedoeld, dat deze stof bij toevoeging van zuur aan de melk, ook het gemakkelijkst ontleed wordt.

grote nauwkeurigheid werd verricht door RINGER ¹⁾ en dat ten doel had na te gaan, hoe de waterstofionenconcentratie van een phosphorzuuroplossing zich wijzigt, indien hieraan natronloog wordt toegevoegd. Met het oog op het belang dezer zaak voor het verkrijgen van een goed inzicht in het gedrag van melk en wei bij de zuurgraadbepaling en ook bij de melkzuurgisting, neem ik de door RINGER gevonden cijfers hier gedeeltelijk over. Zij hebben betrekking op phosphaatoplossingen, die per 100 c.c. 0,2076 Gr. P_2O_5 bevatten, welk phosphorzuur gedeeltelijk tot zout is omgezet door de hoeveelheden loog, die in de 1^{ste} kolom zijn aangegeven. Het eindvolume was steeds 100 c.c.

Tabel I.

	c.c. 0,1131 norm. Na OH toegevoegd.	Waterstofionen- concentratie.
1	0	0,0108
2	6	$7,55 \times 10^{-3}$
3	12,23	$4,55 \times 10^{-3}$
4	18	$2,32 \times 10^{-3}$
5	22,32	$9,83 \times 10^{-4}$
6	24,46	$4,12 \times 10^{-4}$
7	25,76 (NaH_2PO_4)	$6,82 \times 10^{-5}$
8	27,47	$1,68 \times 10^{-6}$
9	30	$5,78 \times 10^{-7}$
10	34,34	$2,32 \times 10^{-7}$
11	38,63	$1,15 \times 10^{-7}$
12	42,93	$7,30 \times 10^{-8}$
13	48,93	$1,78 \times 10^{-8}$
14	51,52 (Na_2HPO_4)	$5,97 \times 10^{-9}$
15	53,23	$1,71 \times 10^{-9}$

Bij beschouwing dezer tabel zien wij het volgende: N^o. 10 vertoont dezelfde H-ionenconcentratie als normale melk, nl. $\pm 2,3 \times 10^{-7}$. N^o. 15 bevat zòdveel H-ionen, of liever hydroxylionen, als noodig zijn om de phenolphthaleïne van kleur te doen veranderen, waarvoor dus nog vereischt werden $53,23 - 34,34 = 18,89$ c.c loog. Vloeistof N^o. 10, die zelf nagenoeg neutraal is, heeft dus een zuurgraad van 18,89° Dornic, (de door RINGER gebruikte loog was nagenoeg $\frac{1}{2}$ norm.), zooals de zuivelchemicus het uitdrukt. En wij zien dus, dat wij bij zulk een phosphaatoplossing volkomen hetzelfde waarnemen als bij versche wei; de zuurgraad hiervan is wel kleiner ($\pm 10^0$ Dornic),

¹⁾ Zeitschrift für Physiologische Chemie Bd. 60, 341 (1909).

maar ze bevat ook slechts $\frac{1}{3}$ à $\frac{1}{2}$ van de hoeveelheid fosphaat, die in bovengenoemde vloeistof aanwezig was. In het wezen der zaak bestaat geen verschil.

Nog een derde stof, die in de melk en ook in het serum en in de wei voorkomt, heeft de eigenschap om hydroxylienen te binden, nl. de opgeloste eiwitstoffen, zooals lactalbumine en de pepton, die in de wei aanwezig is. Ook deze stoffen, die zelf nagenoeg neutraal reageeren, spelen een reguleerende rol, evenals de fosphaten.

Uit een en ander blijkt dus wel, dat de zuurgraad van melk of wei, zooals wij dien door titreeren bepalen, een zeer gecompliceerde grootheid is; de waarde hangt in hooge mate af van de verhouding, waarin de verschillende melkbestanddeelen voorkomen. Hieruit volgt tevens, dat het niet aangaat biologische beschouwingen te gronden op den getitreerden zuurgraad. Aan een ieder, die geroepen is onderwijs te geven in de zuivel-scheikunde of -bacteriologie, kan de volgende eenvoudige lesproef worden aanbevolen, om het verschil te doen uitkomen in den titerzuurgraad en den reëlen zuurgraad.

Men bereide zich een oplossing van zuiver phosphorzuur, die $\frac{1}{30}$ mol. per Liter bevat. Voegt men aan 50 c.c. hiervan 27 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. Na OH toe, dan blijkt de verkregen vloeistof bij titreeren met $\frac{1}{10}$ n. loog, en phenolphthaleïne als indicator, een zuurgraad van 7 te hebben. Bereidt men zich verder een oplossing van $\frac{1}{1000}$ norm. HCl, dan is de zuurgraad hiervan gelijk aan 1. Onderzoekt men de beide vloeistoffen met een lakmoespapiertje of een druppel rosolzuur, dan blijkt de eerste, met den zuurgraad 7, duidelijk alcalisch, de laatste, met den zuurgraad 1, duidelijk zuur te zijn. Door een dergelijk experiment toont men wel zeer sprekend aan, dat men den titerzuurgraad niet als basis nemen mag, als het er op aankomt na te gaan, welke van twee vloeistoffen voor b.v. het leven van bacteriën meer gevaar zal opleveren.

Bovenstaande tabel van RINGER geeft voorts een inzicht in hetgeen gebeurt, indien wei tengevolge van de melkzuurgisting zuur wordt. Nemen wij b.v. weer eens oplossing 10 en denken wij ons daarin het ontstaan van melkzuur. Het is duidelijk, dat dan als het ware de vroeger toegevoegde loog weer geneutraliseerd wordt onder vorming van natriumlactaat, en dat de H-ionenconcentratie van de oplossingen 9, 8, enz. weer worden doorlopen. Zooals hieronder blijken zal, verkrijgt de wei ten slotte ongeveer de C_H van oplossing 7, die *veel* lager is dan ze zijn zou, indien geen fosphaat (en pepton en albumine) in de wei aanwezig was. Uit deze eenvoudige beschouwing blijkt dus ook, dat het niet aangaat te zeggen, zooals wel gebeurt, dat het bij de melkzuurgisting in wei optredende melkzuur in vrijen toestand blijft bestaan. Dat deze opvatting niet juist is, moge verder nog uit het volgende voorbeeld blijken.

Aan drie porties van 25 c.c. in verschen toestand gesteriliseerde

wei werden klimmende hoeveelheden van een melkzuuroplossing toegevoegd, waarvan 2 c.c. = $7,7 \frac{1}{10}$ n. vertegenwoordigden. Van de op deze wijze verkregen vloeistoffen werd de H-ionenconcentratie bepaald en deze vergeleken met die van zuivere melkzuuroplossingen van dezelfde sterkte in gedestilleerd water. De cijfers vindt men in de kolommen 2 en 3 van tabel II.

Tabel II.

Per 25 c.c. wei c.c. melkzuur.	C_H van de aangezuurde wei.	C_H ber. van aangezuurd water.	Concentratie van „vrij” melkzuur in de wei.	Vrij melkzuur in pCt. van toegevoegd zuur aan de wei.
1,7	$9,42 \times 10^{-5}$	184×10^{-5} n.	0,0087 norm.	35
1,5	$7,13 \times 10^{-5}$	170×10^{-5} n.	0,0065 „	30
1,3	$5,57 \times 10^{-5}$	160×10^{-5} n.	0,0047 „	25

Het is duidelijk, dat de wei de eigenschap heeft, om vrijwat zuur te binden. De reële zuurgraad der wei blijkt namelijk 20 à 30 maal kleiner te zijn dan die van de zuivere melkzuuroplossingen, waarin dus geen fosphaten en albumosen aanwezig waren. De vraag, hoe groot dan wel het gehalte aan „vrij” melkzuur in zulke wei is, is beantwoord in kolom 4, terwijl de laatste kolom aangeeft het percentage van het toegevoegde melkzuur, dat in vrijen toestand gebleven is. Slechts 25 à 35 pCt. bleef vrij. Voor niet gesteriliseerde wei is dit percentage nog kleiner. Ten slotte kan nog worden opgemerkt, dat de in kolom 2 opgegeven waarden voor den reëlen zuurgraad der wei na de melkzuurtoevoeging, overeenkomen met die, welke men vindt in spontaan gezuurde fabrieks- of boerderijwei. Over de wijze, waarop de cijfers van kolom 4 werden berekend, zal hieronder nog een en ander gezegd worden; hier zij alleen opgemerkt, dat zij op geen andere wijze te verkrijgen zijn dan door gebruik te maken van een der grondslagen der nieuwere scheikunde: de wet der massawerking.

Bij het meten van den reëlen zuurgraad van eenige weimonsters uit de praktijk werden de volgende cijfers gevonden.

Tabel III.

Herkomst en werkwijze.	Dagen, verstreken na de kaasbereiding.				Getitreeerde zuurgraad. (‰ normaal.)
	1.	2.	3.	4.	
1. Boerderij r. 1)	$3,72 \times 10^{-5}$ n.	—	—	—	44
2. „ r.	—	$8,0 \times 10^{-5}$ n.	—	—	51
3. „ r.	—	—	$7,42 \times 10^{-5}$ n.	—	54
4. „ r.	$5,36 \times 10^{-5}$ n.	$5,5 \times 10^{-5}$ n.	—	—	41,5
5. „ r.	—	$4,0 \times 10^{-5}$ n.	—	—	45
6. „ r.	—	—	$4,0 \times 10^{-5}$ n.	$4,0 \times 10^{-5}$ n.	50
7. „ r.	$5,9 \times 10^{-5}$ n.	—	—	—	46
8. „ r.	—	$4,3 \times 10^{-5}$ n.	—	—	45
9. „ r.	—	—	$5,0 \times 10^{-5}$ n.	—	46
10. „ r.	$4,6 \times 10^{-5}$ n.	—	—	—	42,5
11. „ r.	—	$5,8 \times 10^{-5}$ n.	—	—	47
12. „ r.	—	—	$4,7 \times 10^{-5}$ n.	—	45
13. Fabriek r.	$3,4 \times 10^{-5}$ n.	$4,5 \times 10^{-5}$ n.	—	—	54
14. „ o.	$5,5 \times 10^{-5}$ n.	—	—	—	52
15. „ l.w. 2)	$5,2 \times 10^{-5}$ n.	—	—	—	—

Deze uitkomsten leeren dus, dat de maximale reële zuurgraad van de wei gelijk te stellen is aan $4 \text{ à } 8 \times 10^{-5}$ normaal, een cijfer dat aanmerkelijk lager is, dan door de practici werd vermoed. Een zoutzuuroplossing, die slechts 3 m.gr. per liter bevat, is even sterk zuur.

Na deze ietwat lange uitweiding over het H-ionen-reguleerend karakter der wei, willen wij thans eenige cijfers mededeelen, die betrekking hebben op de in den aanvang van dit artikel besproken kwestie, in hoeverre uit het feit, dat de door titreeren bepaalde zuurgraad van zure melk en van het serum hiervan belangrijk hooger is, dan die van de wei derzelfde melk, besloten mag worden, dat het serum ook zuurder is dan de wei. Om dit na te gaan werden al of niet gesteriliseerde monsters melk en wei geënt met veel zuursel (in den regel 1 druppel reïncultuur op ± 50 c.c. wei) en na korteren of langeren tijd broeden bij 22° C., de reële- en de titerzuurgraad bepaald. De hierbij verkregen uitkomsten vindt men in tabel IV.

1) r. = reïncultuur; 2) l. w. = lange wei.

Tabel IV.

		Reëele zuurgraad.	Titerzuurgraad ($\frac{1}{10}$ normaal).
I	serum	$5,15 \times 10^{-5}$	66,1
	wei.	$6,11 \times 10^{-5}$	40,2
II	serum	$6,11 \times 10^{-5}$	72,0
	wei.	$6,53 \times 10^{-5}$	29,5
III	serum.	$8,07 \times 10^{-5}$	67,0
	wei.	$9,1 \times 10^{-5}$	38,0
IV	serum	$7,68 \times 10^{-5}$	67,6
	wei.	$8,99 \times 10^{-5}$	37,2
V	serum	$6,59 \times 10^{-5}$	65,2
	wei.	$6,98 \times 10^{-5}$	35,0
VI	serum	$7,0 \times 10^{-5}$	68,8
	wei.	$5,6 \times 10^{-5}$	36,8
VII	serum	$7,08 \times 10^{-5}$	70,0
	wei.	$5,5 \times 10^{-5}$	37,2
VIII	serum	$8,47 \times 10^{-5}$	71,6
	wei.	$9,04 \times 10^{-5}$	43,6
IX	serum	$8,06 \times 10^{-5}$	71,2
	wei.	$6,14 \times 10^{-5}$	32,4
X	serum	$7,68 \times 10^{-5}$	67,2
	wei.	$8,06 \times 10^{-5}$	36,4
XI	serum	$8,02 \times 10^{-5}$	70,0
	wei.	$10,3 \times 10^{-5}$	41,6

We zien dus uit deze tabel het volgende:

Terwijl de titerzuurgraden de bekende groote verschillen voor de wei en het serum opleveren, vinden wij die bij de reëele zuurgraden veel kleiner. *In 8 van de 11 onderzochte gevallen bleek de wei zuurder te zijn dan het serum.* Dus ook langs experimenteelen weg blijkt wel duidelijk, dat de hiervoren op theoretische gronden bestreden conclusie der Rijksseruminrichting ongeoorloofd is. Een hogere titerzuurgraad van een lichaamsvocht bewijst volstrekt niet, dat het ook „zuurder” is.

Bij de proeven, waarvan de uitkomsten in bovenstaande tabel IV zijn aangegeven, bleven in de meeste gevallen de kolfjes met melk en wei zóó lang in de broedstoof staan, dat aangenómen kon worden, dat de melkzuurvorming afgelopen was, zoodat de cijfers voor de waterstofionenconcentratie ook als maximale waarden te beschouwen zijn. De omstandigheid, dat in de melk *nagenoeg* dezelfde reële zuurgraad bereikt werd als in de wei, wettigde het vermoeden, dat het ook de H-ionen zijn, die ten slotte het gistingsproces een einde doen nemen, evenals dit het geval schijnt te zijn bij de zuurvorming door coli-bacillen. MICHAËLIS en MARCORA ¹⁾ voegden aan melksuiker houdende bouillon toenemende hoeveelheden natriumhydroxyde toe en entten de buisjes met een cultuur dezer bacteriën, om ze daarna een paar dagen bij 37° C. te broeden. Dan bleek, dat de H-ionenconcentratie in alle buisjes dezelfde was, nl. $\pm 1 \times 10^{-5}$ normaal. Niettegenstaande dus in de verschillende buisjes zeer uiteenlopende hoeveelheden zuur geproduceerd werden, was de eindconcentratie der waterstofionen dezelfde, waaruit besloten kan worden, dat het zeer waarschijnlijk de H-ionen zijn, die de bacteriënwerking ten slotte opheffen.

Om na te gaan of ook bij de melkzuurgisting door gewone cocvormige melkzuurbacteriën (zuursel) inderdaad de waterstofionen remmend werken, sloeg ik een eenigszins anderen weg in. Het is n.l. bekend, dat lactaat-ionen geen beletsel vormen voor een krachtige melkzuurvorming, zooals blijkt uit den gunstigen invloed, welke wordt uitgeoefend door toevoeging van neutraliseerend werkende stoffen, die het gevormde zuur in lactaten omzetten (CaCO_3 , NaHCO_3 , e. a.). Voegt men dus aan b. v. wei eenig calcium- of natriumlactaat toe, dan zal dit op de bacteriënontwikkeling geen nadeeligen invloed uitoefenen, maar door de aanwezigheid van lactaationen wordt de dissociatie van het ontstaande melkzuur teruggedrongen, zoodat voor het bereiken van een *bepaalde* H-ionenconcentratie meer melkzuur gevormd zou moeten worden, naarmate aan de wei meer lactaat wordt toegevoegd. Van dezen gedachtengang uitgaande nam ik de volgende proeven.

Aan gelijke volumina wei werden toenemende hoeveelheden van een normaal-natriumlactaatoplossing toegevoegd en zóóveel gedestilleerd water, dat de volumina ten slotte alle gelijk waren. 90 c.c. werden zodoende tot 100 c.c. verdund. Aan de steriele vloeistoffen werd een druppel van een reïncultuur toegevoegd en gedurende minstens een week, maar meestal langer, bij 22° C. gebroed. Dan werd de toename van den titerzuurgraad bepaald en ook de reële zuurgraad. De volgende tabel geeft de uitkomsten van een dergelijke proef.

¹⁾ Zeitschrift für Immunitätsforschung. XIV. 170 (1912).

Tabel V.

c.c. norm. Na-lactaat per 100 c.c.	Titerzuurgraad vòòr het broeden.	Titerzuurgraad na 8 dagen broeden.	C _H na 8 dagen broeden.
10	8,9	30,0	$1,78 \times 10^{-5}$
8	8,9	31,2	$2,22 \times 10^{-5}$
6	8,9	32,4	$2,76 \times 10^{-5}$
4	8,9	33,2	$3,65 \times 10^{-5}$
2	8,9	34,4	$5,29 \times 10^{-5}$
0	8,9	37,2	$8,99 \times 10^{-5}$

Hieraan zij onmiddellijk tabel VI toegevoegd, die de uitkomst geeft van een proef, waarbij in plaats van natriumlactaat, keukenzout aan de wei was toegevoegd.

Tabel VI.

c.c. norm. Na Cl per 100 c.c.	Titerzuurgraad vòòr het broeden.	Titerzuurgraad na het broeden.	C _H na 14 dagen broeden.
8	7,0	43,5	$10,5 \times 10^{-5}$
6	—	43,6	$9,86 \times 10^{-5}$
4	—	43,6	$9,86 \times 10^{-5}$
2	—	43,7	$10,3 \times 10^{-5}$
0	—	43,6	$9,96 \times 10^{-5}$

Uit tabel V zien wij, dat de eindconcentratie aan H-ionen in de verschillende buisjes volstrekt niet constant is; zij is lager naarmate de wei meer natriumlactaat bevat. In tegenstelling met hetgeen te wachten was, indien in de eerste plaats de waterstofionen de melkzuurvorming tot stilstand brachten, is ook de titerzuurgraad ten slotte het laagst in het kolfje met de hoogste concentratie aan lactaationen.

Wordt in plaats van natriumlactaat, keukenzout toegevoegd in aequivalente hoeveelheden, dan blijkt de reële zuurgraad in alle kolfjes dezelfde te zijn, wanneer de gisting is afgelopen. Hieruit volgt dus (en hieronder volgen meerdere cijfers), dat bij de proef van tabel V niet in de eerste plaats de H-ionen beschouwd kunnen worden als de oorzaak van de opheffing der zuurproductie. Hier rijst

dus als van zelf de vraag: welke stof werkt dan wèl belemmerend op den verderen voortgang van de bacteriënwerking? Van physisch-chemisch standpunt ligt het voor de hand te denken aan de niet gedissocieerde moleculen melkzuur, want, zooals reeds werd opgemerkt, de lactaationen schaden blijkbaar niet rechtstreeks.

De gegevens van tabel V stellen ons in staat, met voldoende nauwkeurigheid te berekenen, welke de concentratie aan ongesplitste moleculen melkzuur geweest is in de kolfjes. Volgens de wet der massawerking toch kunnen wij schrijven:

$$K = \frac{C_H \times C_M}{C_{HM}}$$

waarin K de dissociatieconstante van het melkzuur voorstelt, C_H de concentratie in grammoleculen per L. der waterstofionen, C_M die der lactaationen en C_{HM} die der ongesplitste moleculen. K is bekend ¹⁾, C_H werd gemeten. Indien dus C_M bekend was, zouden wij C_{HM} kunnen berekenen. Nemen wij eens aan, dat al de in de vloeistoffen aanwezige melkzure zouten volledig in ionen gesplitst waren, dan zou C_M gelijk zijn aan de totaal aanwezige hoeveelheid lactaat (onverschillig of dit als zuur of als zout aanwezig is), verminderd met C_{HM} , dus $C_M = \text{Totaal lactaat} - C_{HM}$. Het totaal lactaat vinden wij door optelling van het toegevoegd lactaat en het geproduceerde melkzuur, dat uit onze titreerproeven volgt (zuurgraad na het broeden verminderd met den zuurgraad vóór het broeden, in normaliteit uitgedrukt). De gemaakte veronderstelling, dat al de lactaten in de kolfjes geheel in ionen gesplitst zijn, is niet juist. Waar wij overwegend met natrium- en kaliumlactaat te doen hebben, kunnen wij uit de metingen van OSTWALD ²⁾ de dissociatie voor de verschillende concentraties berekenen. De met de waterstofionen aequivalente lactaationen zijn bij een zwak zuur als melkzuur geheel te verwaarloozen. Noemen wij α den dissociatiegraad van het natriumlactaat, dan kunnen wij dus voor C_M schrijven: $\alpha \times (\text{Totaal lactaat} - C_{HM})$. Dan wordt

$$C_{HM} = \frac{\text{Totaal lactaat}}{1 + \frac{K}{C_H \times \alpha}}$$

Substitueeren wij de waarden van tabel V in deze vergelijking, dan vinden wij, als $K = 147 \times 10^{-6}$ wordt aangenomen, voor C_{HM} de cijfers van kolom 7 van tabel VII, waarin, volledigheidshalve, alle gegevens nog eens zijn opgeteekend.

¹⁾ Volgens OSTWALD is $K = 138 \times 10^{-6}$. Blijkens later door mij verrichte metingen, werd met twee verschillende methoden, (geleidbaarheid en de Bredigsche diazoazijnzure aethylester-ontleding), bij onderling goede overeenstemming, gevonden: 147×10^{-6} . Deze Verslagen No. X. 5. (1911).

²⁾ Lehrbuch der Allgemeinen Chemie. Bd. II. 752.

Tabel VII.

c.c. norm. Na-lactaat per 100 c.c.	Titer vóór het broeden.	Titer na het broeden.	Totaal lactaat	C_H na 8 dagen broeden.	α	C_{HM} na 8 dagen broeden.
10	8,9	30,0	0,121 n.	$1,78 \times 10^{-5}$ n.	0,79	0,0106 n.
8	8,9	31,2	0,1023 n.	$2,22 \times 10^{-5}$ n.	0,80	0,0110 n.
6	8,9	32,4	0,0835 n.	$2,76 \times 10^{-5}$ n.	0,81	0,0110 n.
4	8,9	33,2	0,0643 n.	$3,65 \times 10^{-5}$ n.	0,82	0,0109 n.
2	8,9	34,4	0,0435 n.	$5,29 \times 10^{-5}$ n.	0,83	0,0101 n.
0	8,9	37,2	0,0283 n.	$8,99 \times 10^{-5}$ n.	0,85	0,0096 n.

Uit deze tabel blijkt, dat, bij een sterk uiteenloopen van de waarden voor C_H in de verschillende kolfjes, die voor C_{HM} tamelijk wel constant zijn, waaruit de conclusie kan worden getrokken, *dat het waarschijnlijk de ongesplitste melkzuurmoleculen zijn, die ten slotte voor de melkzuurbacterien schadelijk worden.*

Dezelfde proef werd nog eenige malen herhaald met fermenten van andere herkomst. Om niet te uitvoerig te worden geef ik in de volgende tabellen alleen de kolommen 1, 5 en 7 aan; de cijfers van kolom 7 werden op volkomen dezelfde wijze berekend.

Tabel VIII.

c.c. norm. Na-lactaat per 100 c.c.	C_H	C_{HM}
10	$1,57 \times 10^{-5}$ n.	0,0091 norm.
8	$1,95 \times 10^{-5}$ n.	0,0095 „
6	$3,09 \times 10^{-5}$ n.	0,0116 „
4	$3,24 \times 10^{-5}$ n.	0,0094 „
2	$4,82 \times 10^{-5}$ n.	0,0092 „
0	$9,1 \times 10^{-5}$ n.	0,0105 „

Tabel IX (ander ferment).

c.c. norm. Na-lactaat per 100 c.c.	C_H	C_{HM}
10	$1,34 \times 10^{-5}$ n.	0,0079 norm.
8	$1,40 \times 10^{-5}$ n.	0,0070 "
6	$1,86 \times 10^{-5}$ n.	0,0074 "
4	$2,37 \times 10^{-5}$ n.	0,0070 "
2	$4,21 \times 10^{-5}$ n.	0,0080 "
0	$6,98 \times 10^{-5}$ n.	0,0074 "

Hier volgen nog de uitkomsten van een overeenkomstige proef, waarbij in plaats van wei de volgende voedingsvloeistof werd gebruikt: 2 pct. melksuiker, 0,75 pct. pepton in een oplossing van 0,05 molair Na_2HPO_4 , dat eerst met HCl tegen lakmoes was geneutraliseerd.

Tabel X.

c.c. norm. Na-lactaat per 100 c.c.	C_H	C_{HM}
8	$1,91 \times 10^{-5}$ n.	0,0094 norm.
6	$2,24 \times 10^{-5}$ n.	0,0090 "
4	$2,99 \times 10^{-5}$ n.	0,0088 "
2	$4,11 \times 10^{-5}$ n.	0,0072 "
0	$7,11 \times 10^{-5}$ n.	0,0061 "

Ook bij het gebruik van deze peptonoplossing blijkt de H-ionenconcentratie kleiner te zijn, naarmate meer natriumlactaat was toegevoegd. De waarden voor C_{HM} zijn niet constant, maar vertoonen een regelmatige afnemning. Of deze een gevolg is van een minder zuiver verloop van de gisting dan bij het gebruik van den meer natuurlijke voedingsbodem, de wei, is zonder meer niet te zeggen.

Ook is nog een proef genomen, waarbij in plaats van Na-lactaat, calciumlactaat werd toegevoegd aan de wei. De zaak wordt hierdoor in zooverre ingewikkelder, dat bij toevoeging van calciumzouten aan de wei, deze niet als zoodanig in de vloeistof blijven bestaan, maar er hebben omzettingen plaats, waarbij de calciumionen uit de vloeistof verdwijnen en de zuurgraad (zoowel de titer- als de reële zuurgraad) aanmerkelijk verhoogd wordt. In de wei komen dan ook zeer weinig calciumionen voor, zooals ik reeds voor 9 jaren aantoonde.

Bij de proeven met calciumlactaat blijft dus in de berekening van de waarden van C_{HM} eenige onzekerheid bestaan, daar de dissociatie van de in de wei aanwezige lactaten, de waarde van α dus niet met groote zekerheid bekend is, omdat wij niet weten hoeveel calciumatomen nog als ion in de vloeistof blijven bestaan. Daar echter de groote meerderheid der toegevoegde calciumionen door de wei worden „opgeborgen”, zooals men het wel eens uitdrukt, maken wij geen groote fout, indien wij ook in dit geval voor α de waarden van K en Na-lactaatoplossingen nemen. Bij het berekenen van de cijfers van kolom 3 in tabel XI is dit geschied. Na 14 dagen broeden werd gevonden.

Tabel XI.

Gr. Calciumlactaat per 100 c.c. wei.	C_H	C_{HM}
1,09	$1,40 \times 10^{-5}$ n.	0,0080 n.
0,872	$1,53 \times 10^{-5}$ n.	0,0073 n.
0,654	$1,79 \times 10^{-5}$ n.	0,0068 n.
0,436	$2,35 \times 10^{-5}$ n.	0,0068 n.
0,218	$3,61 \times 10^{-5}$ n.	0,0073 n.
0,00	$5,21 \times 10^{-5}$ n.	0,0069 n.

Ook deze tabel vertoont voor de concentraties van de ongesplitste moleculen in de verschillende kolfjes een nagenoeg constant cijfer, terwijl die der H-ionen weer regelmatig afnemen, naarmate meer calciumlactaat aan de wei was toegevoegd.

Ook indien aan melk natriumlactaat wordt toegevoegd, blijkt de eindconcentratie der H-ionen in het serum na afloop der zuurproductie lager te zijn dan die in het serum der melk als zoodanig. Een voorbeeld vindt men in tabel XII.

Tabel XII.

c.c. norm. Na. lactaat per 100 c.c.	C_H na het broeden.
10	$2,81 \times 10^{-5}$ n.
8	$3,24 \times 10^{-5}$ n.
6	$3,70 \times 10^{-5}$ n.
4	$4,41 \times 10^{-5}$ n.
2	$5,37 \times 10^{-5}$ n.
0	$6,59 \times 10^{-5}$ n.

De invloed van het toegevoegde lactaat schijnt hier intusschen kleiner te zijn dan bij het gebruik van wei als voedingsbodem. Voor het maken van berekeningen leent zich de melk minder goed, omdat de adsorptie van melkzuur aan de neergeslagen caseïne een zeer onzekeren factor vormt.

Ook indien het natriumlactaat gedurende het gistingsproces ontstaat, wordt de waterstofionenconcentratie minder hoog opgevoerd, indien zich meer lactaat in het medium vormt. Dit bleek o. a. uit het feit, dat bij toevoeging van natriumhydroxyde aan de melk, vóór de enting met de melkzuurbacteriën, de eindconcentratie lager was naarmate meer alcali was gebruikt, zooals tabel XIII doet zien.

Tabel XIII.

c.c. n. loog per 100 c.c. melk.	C_H .
0	$6,89 \times 10^{-5}$ n.
1	$6,11 \times 10^{-5}$ n.
2	$5,37 \times 10^{-5}$ n.
3	$5,07 \times 10^{-5}$ n.

Na deze uitkomsten lag nu de vraag voor de hand, of de H-ionen op de melkzuurbacteriën dan niet giftig werken, terwijl zij ten opzichte van coli-bacillen, zooals reeds vermeld werd, dit wel doen.

Om dit na te gaan werden opnieuw proeven met wei genomen. Hieraan werd echter vóór de toevoeging van de melkzuurbacteriën zóóveel zoutzuur toegevoegd, dat de bij de later optredende melkzuurgisting zich vormende moleculen ongesplitst melkzuur de concentratie van $\pm 0,01$ normaal eerst bereiken konden bij een belangrijk hooger H-ionenconcentratie dan die, welke bij de vorige proeven ontstond.

Aan 4 kolfjes met 50 c.c. wei werden toenemende hoeveelheden n. HCl toegevoegd en daarna werden zij zwaar geënt met de cultuur. Na 6 dagen broeden bij 22° C. werd de toeneming van den titerzuurgraad bepaald. De reële zuurgraad was vóór het broeden gemeten. Het resultaat na 6 dagen broeden is in tabel XIV opgegeven. De wei zonder toevoeging van zuur leverde na de gisting $C_H = 5,6 \times 10^{-5}$ n.

Tabel XIV.

Toegevoegd aan 50 c.c. wei c.c. n. HCl.	C_H vóór het broeden.	Titer vóór het broeden per 100 c.c.	Titer na het broeden per 100 c.c.
0,5	$0,76 \times 10^{-5}$ n.	18,6	35,0
0,8	$2,73 \times 10^{-5}$ n.	24,3	33,6
1,0	$5,70 \times 10^{-5}$ n.	28,2	32,2
1,3	$17,0 \times 10^{-5}$ n.	34,4	34,2

Uit dit tabelletje blijkt dus, dat in de eerste 3 kolfjes nog duidelijk melkzuurvorming heeft plaats gehad, in het vierde daarentegen niet. In kolfje 3 was de waarde van C_H vóór het broeden gelijk aan die, welke de wei zonder toevoeging van HCl na de gisting had verkregen ($5,6 \times 10^{-5}$ n.), maar toch had in dit kolfje nog duidelijk een vermeerdering van titer plaats. In het vierde kolfje daarentegen heeft geen spoor van zuurvorming meer plaats gehad en het ligt voor de hand aan te nemen, dat in dit geval de waterstofionen het beletsel hiervoor geweest zijn ¹⁾. Indien dit het geval is, moet de „grensconcentratie” dus liggen tusschen 5,7 en 17×10^{-5} norm. Dat bij kolfje 3 de bacteriënwerking niet is opgehouden tengevolge van de opgetreden ongesplitste melkzuurmoleculen is waarschijnlijk, want de totale lactaatconcentratie bedroeg slechts 0,004 norm., en die van het melkzuur dus nog minder.

De proef werd nog eens herhaald met een grooter aantal kolfjes, waarbij de verschillen in reëlen zuurgraad vóór het broeden kleiner werden gekozen. Bovendien werden ook na het broeden de waarden voor C_H bepaald, zoodat ook C_{HM} kon worden berekend. De vloeistoffen stonden 13 dagen bij 22° C. Zie tabel XV.

Deze tabel leert nu het volgende. De wei, waaraan geen HCl was toegevoegd, bereikte $C_H = 6,61 \times 10^{-5}$. De kolfjes 2, 3, 4, 5 en 6, die gedeeltelijk vóór het broeden reeds een hogere C_H opleverden, vertoonden alle een zoodanige melkzuurproductie, dat de eindwaarde voor C_H op rond 10×10^{-5} n. is te stellen (kolfje 2 viel wat laag uit). Daar blijkens de laatste kolom de concentratie der ongesplitste moleculen melkzuur ver beneden de fatale hoeveelheid, die kolfje 1 vertoont, gelegen is, moeten wij aannemen, dat in deze kolfjes de werking opgehouden is tengevolge van het be-

¹⁾ De mogelijkheid is echter niet uitgesloten, dat phosphorzuur giftig werkt. Om dit uit te maken zouden afzonderlijke onderzoekingen verricht moeten worden.

Tabel XV.

Titer vóór het broeden.	Titer na het broeden.	C _H vóór het broeden.	C _H na het broeden.	C _{HM} na het broeden.
1. 8,2 ¹⁾	36,0 ¹⁾	—	$6,61 \times 10^{-5}$ n.	0,0076 n.
2. 23,6	30,8	$3,7 \times 10^{-5}$ n.	$8,04 \times 10^{-5}$ n.	0,0024 n.
3. 25,2	31,2	$5,53 \times 10^{-5}$ n.	$10,2 \times 10^{-5}$ n.	0,0023 n.
4. 26,0	30,8	$6,86 \times 10^{-5}$ n.	$9,9 \times 10^{-5}$ n.	0,0024 n.
5. 27,0	30,8	$7,36 \times 10^{-5}$ n.	$11,1 \times 10^{-5}$ n.	0,0015 n.
6. 27,6	30,6	$9,27 \times 10^{-5}$ n.	$11,5 \times 10^{-5}$ n.	0,0012 n.
7. 28,8	31,2	$13,3 (?) \times 10^{-5}$ n.	$15,2 \times 10^{-5}$ n.	0,0012 n.
8. 30,0	32,0	$13,3 \times 10^{-5}$ n.	$14,6 \times 10^{-5}$ n.	0,0009 n.
9. 31,6	32,8	$17,7 \times 10^{-5}$ n.	$17,8 \times 10^{-5}$ n.	0,0006 n.

reiken van het H-ionengehalte 10×10^{-5} n., behoudens hetgeen in de noot op bladz 16 werd opgemerkt. Echter ook in de kolfjes 7 en 8 en zelfs nog sporadisch in 9 ²⁾ had een weinig gisting plaats, niettegenstaande de C_H vóór het broeden boven 10×10^{-5} n. lag

Waar wij met levende wezens te doen hebben, behoeft dit niet te verwonderen. Van de bacteriën, die bij de overenting in een voor haar ontwikkeling ongunstig milieu gebracht worden, zal allicht een klein deel nog tot eenige werkzaamheid in staat zijn, terwijl dit bij de overgrootte meerderheid niet meer het geval is. Dit heeft tengevolge, dat de grens, die voor den bacteriëngroei bedenkelijk wordt, niet zeer scherp is vast te stellen. Ook bij andere bacteriën werd deze ervaring opgedaan, zooals algemeen bekend is. Blijkens de gevonden cijfers schijnt de waarde 10×10^{-5} norm. ongeveer de grens te zijn. Dit is in zooverre interessant, dat, mocht het bij voortgezet onderzoek juist blijken — het weinige materieel dat dit artikel brengt is voor het trekken van positieve conclusies veel te gering — deze grenswaarde slechts weinig hoger ligt dan die, welke men bij de zuring van de wei vindt. Ja, nu en dan werd deze waarde wel bereikt bij wei. Het is duidelijk, dat de

1) Wei zonder HCl toevoeging.

2) Volgens de titerzuurgraden zou nog een met 1,2 c.c. $1/10$ n. loog aequivalente hoeveelheid melkzuur gevormd zijn. De fout in de titratie is met 4 vermenigvuldigd, omdat 25 c.c. getitreerd werden. Een toename van 1,2 c.c. zou zich in de C_H duidelijker geuit hebben. Kolfje 9 vertoonde bovendien geen spoor van troebeling.

beantwoording der vraag, of in een gegeven geval de melkzuurproductie ophoudt tengevolge van de concentratie der ongesplitste moleculen melkzuur, dan wel door die van de waterstofionen, zal afhangen van de meer of minder sterk reguleerende werking van het medium. Konden wij de gisting laten plaats hebben in een melksuikeroplossing zonder reguleator, dan zou blijkens de vergelijking op bldz. 11 de waarde van 10×10^{-5} norm. voor CH bereikt zijn als die voor de niet gedissocieerde moleculen bedroeg

$$\frac{(10 \times 10^{-5})^2}{147 \times 10^{-6}} = 0,00005 \text{ norm.},$$

dat is een onbetekende hoeveelheid in vergelijking met die, welke volgens mijn bevinding schadelijk werkt. Werkt daarentegen de voedingsvloeistof in sterke mate als buffer, zooals bij de wei het geval is — en door toevoeging van fosphaat of pepton kan de reguleerende werking nog worden versterkt — dan wordt de fatale concentratie der niet gedissocieerde moleculen melkzuur bereikt, vòrdat de gevaarlijke CH optreedt. Waar nu de grenswaarde voor CH zoo dicht ligt bij die, welke men bij spontaan gezuurde wei vindt, ligt de veronderstelling voor de hand, dat in zure wei zoowel de ongesplitste moleculen als de H-ionen ten slotte hun invloed doen gelden. Er zij echter nogmaals op gewezen, dat de juistheid dezer beschouwingen door voortgezet onderzoek dient te worden gecontroleerd. Toch kan reeds nu gezegd worden, dat bij de studie der biologische eigenschappen van zuurproduceerende bacteriën met de reguleerende werking van den voedingsbodem ter dege rekening gehouden moet worden. ¹⁾ Dit moge uit een enkel voorbeeld blijken, dat ontleend is aan een mededeeling van Prof. ORLA JENSEN op het zesde internationaal Zuivelcongres in 1914 te Bern gehouden. ²⁾ Deze schrijver wees er bij die gelegenheid op, dat onze kennis van de melkzuurbacteriën nog in vele opzichten te kort schiet, reden waarom hij een op veeljarig onderzoek gegronde wetenschappelijke klassificatie der echte melkzuurbacteriën van het zuivelbedrijf in uitzicht stelde; over de biologische kenmerken kon hij reeds te Bern mededeelingen doen. Zoo lezen wij o. a. het volgende:

„Als erstes Merkmal zur Identifizierung einer Milchsäurebakterie stellen wir also die Art und Weise auf, in welcher sie ihre Nährstoffe und Energiequellen verwertet, denn dies ist das Charakteristischste eines jeden Lebewesens. Als zweites Merkmal kommt dann, welche verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen sie auszunützen imstande ist. Was die Stickstoffquellen betrifft, so wissen wir, dasz die echten Milchsäurebakterien sehr grosze Ansprüche stellen und

¹⁾ Toen dit artikel reeds voltooid was, kwam mij een verhandeling van TIMPE (Archiv für Hygiene, 18. 1 (1893) onder de oogen, waaruit blijkt, dat deze schrijver reeds voor 25 jaren gewezen heeft op de binding van melkzuur door eiwit en pepton in voedingsbodems.

²⁾ Milchw. Zentralblatt 44. 136. (1915).

nur dann wachsen, wenn ihnen ganz bestimmte Eiweiszstoffe oder Peptone zur Verfügung stehen. Bereits 1898 habe ich gezeigt (Centralblatt für Bakteriologie II Abt. IV. 196), dass verschiedene Milchsäurebakterien besser mit Kaseinpepton als mit Fibrinpepton (Pepton-Witte) gedeihen. Dies scheint nach meinen späteren Untersuchungen eine allgemeine Regel für die echten Milchsäurebakterien der Milchwirtschaft zu sein; jedoch reagieren nicht alle Arten gleich stark in dieser Richtung, sondern die mehr oder weniger ausgesprochene Vorliebe für Kaseinpepton ist eben ein wichtiges Artmerkmal

Die echten Milchsäurebakterien sind nicht nur sehr wählerisch bezüglich der Art der Stickstoffquellen, sondern sie ziehen auch dieselben in sehr grossen Konzentrationen vor und sind z.B. oft nicht in einer Lösung mit nur $\frac{1}{2}$ proc. Witte-Pepton zum Wachstum zu bringen. Um diese Verhältnisse zu erläutern, führe ich die Säuremengen an (in $\frac{1}{4}$ norm. pro 100 c.c.) welche von vier verschiedenen Milchsäurebakterien (I, II, III und IV) in einer Nährsalzlösung mit 2 proc. Traubenzucker und verschiedenen Peptonmengen gebildet wurden.

Tabel XVI.

	Witte-Pepton Proc.					Kasein-Pepton. Proc.
	$\frac{1}{2}$	2	5	10	15	3,5
I	11	24	33	45	53	44
II	15	32	44	47	50	51
III	0	7	13	19	25	26
IV	17	36	52	53	53	64

Wie man sieht, bilden alle vier Organismen mehr Säure in der 3,5 Proc.-igen Kaseinpeptonlösung als in der 5 Proc.-igen Wittepeptonlösung. Durch Erhöhung der Menge des Wittepeptons auf 15 Proc. bildet N^o. 1 mehr Säure, N^o. II und III nur ebenso viel und N^o. IV stets weniger Säure als in der Kaseinpeptonlösung."

Alvrens over te gaan tot een nadere beschouwing van hetgeen ORLA JENSEN hier zegt, moet er op gewezen worden, dat de schrijver blijkens het geciteerde artikel in het Centralblatt für Bakteriologie door „Kasein-pepton” verstaat: gepeptoniseerde melk. Al of niet gesteriliseerde melk werd met zoutzuur aangezuurd, met pepsine bij broedtemperatuur behandeld gedurende 24 à 48 uren en het zoutzuur door natriumhydroxyde weer geneutraliseerd. De geklaarde en ge-

steriliseerde vloeistof werd met de culturen van melkzuurbacteriën geënt.

Tegen de beschouwingen van Prof. JENSEN is m. i. een overwegend ernstig bezwaar aan te voeren, nl. dit, dat de schrijver in geen enkel opzicht rekening heeft gehouden met de beteekenis van de reguleerende werking van de verschillende bestanddeelen van de door hem gebruikte voedingsvloeistoffen. Wanneer blijkt, dat het regel schijnt te zijn, dat de echte melkzuurbacteriën van het zuivelbedrijf zich beter ontwikkelen in Kasein-pepton (d. i. dus gepeptoniseerde melk) dan in fibrin pepton (pepton Witte), kan daaruit nog niet besloten worden, dat het eerste een beter voedsel is voor de genoemde bacteriën dan het laatste. Het gedrag der bacteriën ten opzichte van deze beide stoffen werd immers bepaald door meting van de hoeveelheid melkzuur, die in beide voedingsvloestoffen werd ontwikkeld en daarbij werd over het hoofd gezien dat de gepeptoniseerde melk veel meer zuurbindende stoffen bevat dan de andere oplossingen. In den aanvang van dit artikel is reeds uiteengezet op welke wijze in de gepeptoniseerde melk de betrekkelijk groote hoeveelheid fosphaat en pepton werkt; bij het titreeren fungeert zoowel het fosphaat als het gevormde lactaat als zuur, terwijl de concentratie aan vrij melkzuur zeer laag blijft. Hieraan is het immers ook toe te schrijven, dat in melk zooveel meer zuur gevormd wordt dan in de wei. Het blijft dus de vraag of de voorliefde der melkzuurbacteriën voor de Kasein-pepton gelegen is in den aard van de stof, dan wel in de sterke „buffer”werking van het medium. Waar de schrijver deze voorliefde als een „wichtiges Artmerkmal” beschouwt, dient de kwestie nog wel eens wat nader onderzocht te worden. ¹⁾

Ook de cijfers van bovenstaand tabelletje, die den invloed van de hoeveelheid pepton in het voedingsmedium doen uitkomen, zijn ongedwongen te verklaren uit het zuurbindingsvermogen van het pepton, dat tot op zekere hoogte dezelfde rol speelt als koolzure kalk, die aan een voedingsbodem voor melkzuurbacteriën wordt toegevoegd. Het aan kalk gebonden melkzuur vindt men bij het titreeren echter niet terug, dat aan pepton gebonden is daarentegen wel. Voegen wij dus een groote hoeveelheid pepton toe, dan bindt deze melkzuur en er zal dus in dit geval meer zuur geproduceerd moeten worden, vòòrdat de fatale concentratie bereikt wordt, dan wanneer zich minder pepton in de vloeistof bevindt. In dit verband moet nog op een onderzoek gewezen worden van denzelfden schrijver ²⁾ waar de gunstige invloed van toevoeging van pepton aan wei voor de melkzuurvorming wordt

¹⁾ In het hiervoren genoemde artikel komt TIMPE zelfs tot de conclusie, dat de gunstige werking van meer pepton *uitsluitend* aan zijn vermogen om melkzuur te binden zou moeten worden toegeschreven.

²⁾ Revue générale du lait 1905—1906, 464.

toegeschreven aan stikstofgebrek van de gesteriliseerde wei. Ook in die verhandeling wordt van het zuurbindingsvermogen van het pepton niet gerept, zoodat ook deze vraag nog open blijft.

Ten slotte mogen nog enkele cijfers van dezen schrijver volgen ¹⁾, die betrekking hebben op den aard van den voedingsbodem voor melkzuurbacteriën en die mij aanleiding gegeven hebben tot het verrichten van eenige metingen, waaruit de meer of minder sterk reguleerende werking van zulke media volgt.

In tabel XVII vindt men de hoeveelheden melkzuur aangegeven, uitgedrukt in c.c. $\frac{1}{10}$ n. per 100 c.c., die volgens Prof. JENSEN gevormd werden in verschillende media, na 4 dagen broeden bij 35° C.

Tabel XVII.

	pCt. N.	c.c. $\frac{1}{10}$ melkzuur gevormd in 100 c.c.			
		Bac. α .	Bac. β .	Bac. γ .	Bac. ϵ .
Wei	0,092	6,0	3,0	10	9,0
Wei + 1 pCt. pepton	0,227	18,0	7,0	37	53,0
Gepept. melk	0,394	91,0	22,5	42	91,5

Ook uit deze cijfers bleek, dat toevoeging van pepton aan de wei de vorming van aanmerkelijk meer zuur tengevolge heeft en dat dit bij gebruik van gepeptoniseerde melk in nog veel sterker mate het geval was.

Om een oordeel te krijgen over het zuurbindend vermogen van voedingsbodems als waarvan hier sprake is, nam ik de volgende proeven:

Aan eenige gelijke hoeveelheden gesteriliseerde wei werden toenemende hoeveelheden van een melkzuuroplossing toegevoegd en zóóveel water, dat de eindvolumina weer aan elkander gelijk waren. Daarna werd de waterstofionenconcentratie der vloeistoffen gemeten. Dezelfde wei, waaraan 2 pCt. pepton-WITTE was toegevoegd, en een monster gepeptoniseerde melk, bereid volgens het voorschrift van ORLA JENSEN, behandelde ik op volkomen dezelfde wijze. Tabel XVIII geeft de verkregen uitkomsten, die in de figuur grafisch voorgesteld zijn.

¹⁾ Centralblatt für Bakteriologie II Abt, IV, 196.

Tabel XVIII.

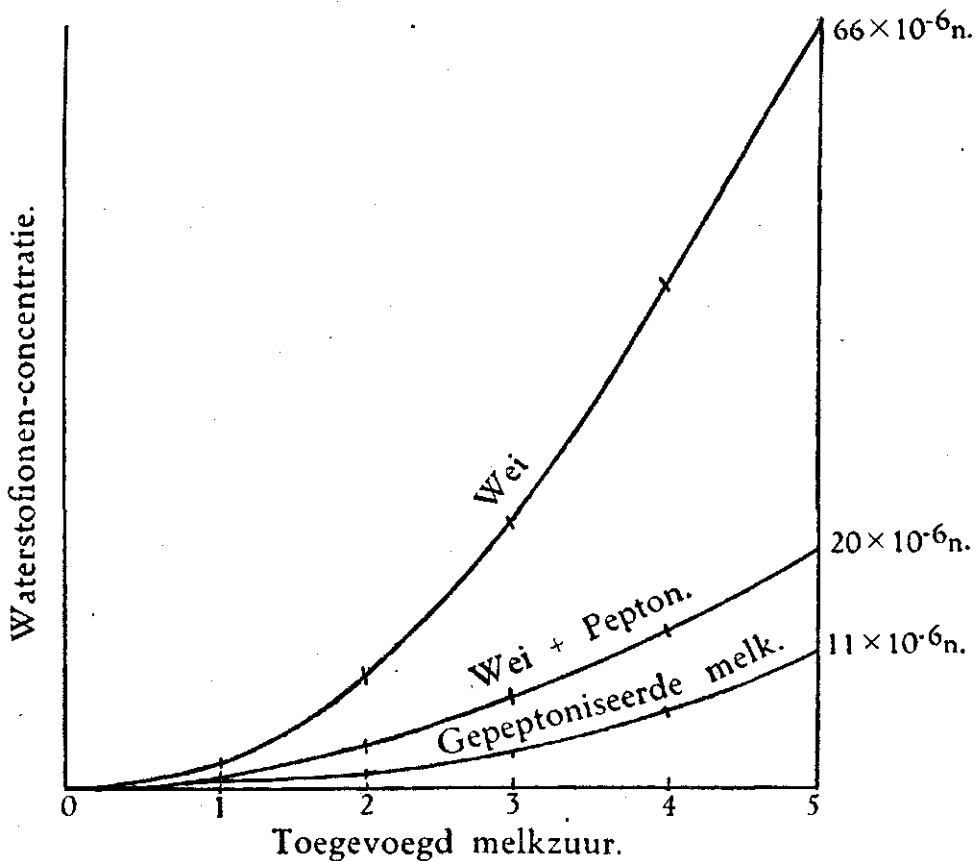
Toegevoegd aan 100 c.c.	Waterstofionenconcentratie.		
	Wei (0,077 pCt. N).	Wei + 2 pCt. pepton (0,363 pCt. N)	Gepept. melk (0,395 pCt. N).
1. 5 c.c. water	$0,34 \times 10^{-6}$	$0,30 \times 10^{-6}$	$0,52 \times 10^{-6}$
2. 4 c.c. water + 1 c.c. $\frac{1}{2}$ n. melkzuur.	$1,54 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-6}$	$0,87 \times 10^{-6}$
3. 3 " " + 2 " " "	$9,73 \times 10^{-6}$	$3,13 \times 10^{-6}$	$1,83 \times 10^{-6}$
4. 2 " " + 3 " " "	$21,8 \times 10^{-6}$	$7,4 \times 10^{-6}$	$2,65 \times 10^{-6}$
5. 1 " " + 4 " " "	$43,3 \times 10^{-6}$	$13,4 \times 10^{-6}$	$5,63 \times 10^{-6}$
6. 0 " " + 5 " " "	$66,2 \times 10^{-6}$	$20,2 \times 10^{-6}$	$11,0 \times 10^{-6}$

Bij deze cijfers en bij de curven, die een voorstelling ervan zijn, is verdere toelichting eigenlijk overbodig. We zien, dat de hoeveelheid melkzuur, die in de wei als zoodanig een reëlen zuurgraad veroorzaakt, welke overeenkomt met die van spontaan gezuurde wei ($\pm 6 \times 10^{-5}$), de wei + pepton tot een driemaal — en de gepeptoniseerde melk tot een zesmaal lageren zuurgraad opvoert. Alleen reeds op dezen grond behoeft het ons niet te verwonderen, dat de melkzuurbacteriën in wei + pepton meer dan in wei en in gepeptoniseerde melk het meeste zuur vormen. Of hier de aard van de voedingsstoffen rechtstreeks invloed uitoefent dient nog nader beezen te worden.

Hoewel de in dit opstel gegeven cijfers en beschouwingen verre van volledig zijn, kan toch, naar ik geloof, wel aangenomen worden, dat men bij de studie van de biologische eigenschappen der melkzuurbacteriën, die in het zuivelbedrijf zoo'n groote rol spelen, meer dan tot nu toe, rekening zal moeten houden met de moderne opvattingen op chemisch gebied. Doet men dit niet, dan is te voorzien dat veel werk, door ijverige en bekwame onderzoekers verricht, tengevolge van verkeerde praemissen tot verwarring aanleiding geeft, zooals dat op het gebied der kaaschemie ook het geval is geweest. Er ligt hier een ruim veld open voor samenwerking van bacterioloog en chemicus. Onderzoekingen als de hierboven medegedeelde, op ruime schaal en met verschillende melkzuurbacteriën verricht, kunnen zonder twijfel bijdragen tot het verkrijgen van een nauwkeuriger kennis van de eigenschappen dezer organismen. Ook voor het verkrijgen van een dieper inzicht in de melkzuurgisting in de kaas zouden dergelijke onderzoekingen misschien nuttig kunnen zijn.

Verder doet zich de vraag voor, of een „standaard” voedingsbodem bereid uit caseïne en leb in een fosphaatmengel van bepaalde CH,

en dus ook van bepaalde bufferwerking, bij deze studie geen voordeel zou kunnen opleveren; de chemie stelt ons tegenwoordig immers in staat om zooveel scherper te precificeeren dan vroeger.



Der Säuregrad von Milch[und] Molke.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Er wurde darauf hingewiesen, dass die Voraussetzung, das Milchsérum spontan gesäuerter Milch sei saurer als die sauren Molken, weil ersteres beim Titrieren einen sehr viel höheren Säuregrad zeigt als letztere, falsch ist. Es wurde die starke „Puffer“wirkung der Milch und Molke erklärt und deren Folgen aufgeklärt. Der reelle Säuregrad

verschiedener Muster von Molken aus Molkereien und Bauernhöfe, wurde zu $4 \text{ à } 8 \times 10^{-5}$ n. gefunden. Beim Impfen von Milch und deren Molke mit gewöhnlichen Coc-förmigen Milchsäurebakterien (Reincultur der Käseerei) erreichten beide Medien bei 22° C. etwa die gleiche Wasserstoffionenconcentration. In den meisten Fällen war der reelle Säuregrad der Molke nur um ein Geringes höher als derjenige des Milchserums. Beim Titrieren wird der Säuregrad des letzteren bekanntlich bedeutend höher gefunden. Die Frage ob die Milchsäuregärung durch die gewöhnlichen Cocförmigen Bakterien schliesslich gehemmt wird entweder infolge der Wirkung der entstandenen Wasserstoffionen oder durch diejenige der nicht dissociierten Milchsäuremolekeln, wurde mit Wahrscheinlichkeit dahin gelöst, dass in gesäuerter Molke sowohl erstere als letztere der weiteren Gärung ein Hinderniss stellen. Fügt man aber der Molke lösliche Laktate zu, durch welche die Dissociation der Milchsäure zurückgedrungen, die Concentration der nicht dissociierten Molekeln also vermehrt wird, so wird die weitere Säurebildung aufgehoben, wenn die Concentration der undissociierten Molekeln etwa $0,01$ norm. erreicht hat. In solchen Fällen bleibt die End-H-ionenconcentration niedriger als der fatalen Menge, die zu $\pm 10 \times 10^{-5}$ norm. gefunden wurde, entspricht. Fügt man der Molke vor der Impfung Salzsäure zu, so wird nur soviel Milchsäure gebildet, dass die End-H-ionenconcentration $10 \text{ à } 20 \times 10^{-5}$ n. erreicht wird. In diesem Falle bleibt die Menge der undissociierten Molekeln unterhalb der obergenannten fatalen Concentration; die Hemmung der Gärung wird dann wahrscheinlich durch die Wasserstoffionen verursacht. Es wurde nachdrücklich betont, dass die erhaltenen Resultate durch mehrere Versuche erhärtet werden müssen, weil das vom Autor gelieferte Zahlenmaterial noch zu wenig umfangreich ist. Es wurde weiter darauf hingewiesen, dass man beim Studium der biologischen Eigenschaften der Milchsäurebakterien der Milchwirtschaft, die Zusammensetzung der Kulturmedien, namentlich deren Pufferwirkung, mehr in Betracht ziehen muss als bisweilen geschieht. Dies wurde an ein Paar Beispielen aus der Litteratur gezeigt. Schliesslich wurde die Pufferwirkung von Molke, Pepton-Molke und peptonisierte Milch an einigen Zahlen und Kurven gezeigt.

Hoorn, October 1917.