

BOEKELSCHOURBACTERIËN

DOOR

J. W. PETTE EN J. VAN BEYNUM

(Ingezonden 10 Juni 1943)

1. Inleiding

In kazen ontstaan soms na eenige weken kleine scheurtjes in het zuivel. Deze meer of minder lensvormige openingen ter grootte van ongeveer 1 cm traden vooral op den voorgrond nadat men overgegaan was tot de werkwijze van BOEKEL, waarbij aan de kaasbakmelk z.g. „lange wei” werd toegevoegd en de kaas uit één stuk werd gemaakt. Om deze reden gaf men deze scheurtjes den naam „boekelscheuren”.

De aanwezigheid van dergelijke scheurtjes wordt als een fout in de kaas aangemerkt, in tegenstelling tot het voorkomen van enkele ronde openingen. Toeh bleek bij een onderzoek, waarover BOEKHOUT in 1909 berichtte (1), dat het gas, dat in beide soorten van openingen aanwezig is, dezelfde samenstelling bezit. Het bestaat naast stikstof, dat wel altijd in kaasgas aanwezig is, uit kooldioxyde en waterstof. BOEKHOUT was daarom van oordeel, dat het ontstaan van scheurtjes te danken was aan een normale gasontwikkeling in kaas met onvoldoende plasticiteit.

Deze gasontwikkeling werd naar hij meende in beide gevallen veroorzaakt door dezelfde bacteriën, de bacteriën van de „normale gasvorming in kaas” of „boekelscheurbacteriën”, waarvan de eigenschappen in 1915 door BOEKHOUT en OTT DE VRIES nader werden beschreven (2). In het vervolg zullen wij slechts den naam „boekelscheurbacteriën” blijven gebruiken.

Bij dit onderzoek werden de boekelscheurbacteriën geïsoleerd uit een aantal kazen, welke uit Friesland afkomstig waren. De isolatie geschiedde met behulp van een voedingsvloeistof, bestaande uit pepton en calciumlactaat, waaraan wat dikaliumphosfaat en keukenzout was toegevoegd. Na ophooping in deze vloeistof werd afgestreken op weigelatine of pepton-calciumlactaat-gelatine en onder de hierop groeiende koloniën kwamen de boekelscheurbacteriën slechts in zeer beperkt aantal voor. De isolatie is dan ook moeilijk, maar in de onderzochte kazen werden zij toch steeds aangetroffen.

Van de door BOEKHOUT en OTT DE VRIES gegeven beschrijving der eigenschappen kunnen wij volstaan met het belangrijkste aan te stippen.

Het zijn peervormige staafjes, die uit calciumlactaat azijnzuur, kooldioxyde en waterstof vormen.

Werd calciumlactaat vervangen door natriumlactaat dan trad geen gasvorming op.

Ook tal van suikers werden aangetast. Hierbij ontstond een nietvluchtig zuur, dat niet nader geïdentificeerd kon worden, doch volgens

L1571160

hen geen melkzuur was. Zichtbare gasvorming trad daarbij meestal niet op, in welk geval ook de azijnzuurvorming achterwege bleef. Soms echter was er wel gisting, speciaal bij de disacchariden.

Merkwaardig was nog, dat lactose door slechts enkele stammen omgezet kon worden, terwijl toch met alle stammen groei op weigelatine plaats vond.

Hoewel luchtzuurstof den groei der boekelscheurbacteriën niet verhinderde, bleken zij toch het beste anaerob te kweeken.

Werden zij uitgezaaid in weigelatine in een hooge laag, dan trad wel groei doch geen gasvorming op. Werd ditzelfde gedaan in pepton-calciumlactaat-gelatine, dan ontstond een sterke gasontwikkeling.

Het is dus wel duidelijk, dat de vorming van kooldioxyde en waterstof, die in calciumlactaatbodems optreedt, in suikerhoudende media achterwege blijven kan.

Hoewel de boekelscheurbacteriën geïsoleerd waren met dezelfde voedingsvloeistof, waarmede uit Emmentaler kaas de propionzuurbacteriën waren geïsoleerd, zijn zij hiermede niet identiek. De vorming van waterstof door de boekelscheurbacteriën is b.v. een karakteristiek verschil.

Bij onze onderzoekingen over gasvorming in kaas (3) bleek het voorkomen van boekelscheurbacteriën in Nederlandsche kaas veel minder algemeen te zijn dan door BOEKHOUT en OTT DE VRIES werd verondersteld en zooals zij door den naam „normale gasvorming” hebben willen uitdrukken. Wel kregen wij den indruk, dat ze in Friesland meer verbreid zijn dan elders in ons land. Waar door hen alleen een aantal kazen uit Friesland in het onderzoek betrokken werd, zou hieruit hun standpunt te verklaren zijn.

In het licht van onze laatste onderzoekingen zijn de boekelscheurbacteriën op te vatten als ongewenschte bacteriën in kaas, welke door een besmetting in de kaasbakmelk terecht kunnen komen.

Aangezien ze in 13 van de 74 door ons onderzochte practijkkazen voorkwamen, mag hun belang zeer zeker niet onderschat worden. Af en toe geven zij zelfs aanleiding tot het ontstaan van ernstig „laat-los”.

Een nader onderzoek naar het gedrag en de eigenschappen van deze, zooals we zullen zien, zeer merkwaardige bacteriesoort was voor onze onderzoekingen over de gasvorming in kaas zeer gewenscht, temeer waar het hier een bacteriesoort betreft, welke tot nu toe in andere landen blijkbaar niet werd aangetroffen.

2. Isolatie

Voor de isolatie der boekelscheurbacteriën gebruikten wij veel de door BOEKHOUT en OTT DE VRIES aangegeven pepton-calciumlactaat-vloeistof. Deze bevat:

- 2 % pepton Witte;
- 2 % calciumlactaat;
- 0,2 % K_2HPO_4 ;
- 0,5 % NaCl.

Zoals ook zij reeds opmerkten, is de isolatie niet gemakkelijk. Eensdeels is dit te wijten aan den moeilijken en langzamen groei der bacteriën in de lactaatvloeistof, anderdeels aan het feit, dat bij de bij de ophooping gebruikte kweektemperatuur van 30° C en de anaerobe omstandigheden ook de propionzuurbacteriën en de lactaatvergistende boterzuurbacteriën gunstige groei-kansen hebben. Ook de colibacteriën kunnen zich, naar wij herhaaldelijk ondervonden, in deze ophoopingsvloeistof nog ontwikkelen. De bodem is dus niet zeer selectief.

Wij trachtten hieraan tegemoet te komen door den pH der vloeistof, welke omstreeks 5,5 bedraagt, met verdund zoutzuur tot 4,5 te verlagen. Inderdaad had dit succes. Werd kaas, waarin alle vier soorten bacteriën voorkwamen, in pepton-calciumlactaat pH = 4,5 gebracht en anaerob bij 30° C gekweekt, dan ontwikkelden zich in de buizen, waarin 0,1 en 0,01 g kaas geënt was, veelal nog meerdere soorten; in de hoogere verdunningen verkregen echter de boekelscheurbacteriën sterk de overhand, omdat zij minder gevoelig zijn voor zuur dan de andere.

Getracht werd een nog grootere selectiviteit van den bodem te verkrijgen door het gehalte aan NaCl te verhoogen. Dit had echter een averechtsche werking, daar boekelscheurbacteriën voor keukenzout nogal gevoelig zijn. In overeenstemming met de vroegere onderzoekingen werd gevonden, dat maximaal 4½ % NaCl verdragen wordt. De propionzuurbacteriën verdragen hoogere concentraties.

Een goede bodem bleek ook de voor de isolatie van propionzuurbacteriën gebruikte gistautolysaat-natriumlactaat-agar (4). De boekelscheurbacteriën vormen hierin evenals propionzuurbacteriën vleugelkoloniën, maar van een veel kleiner formaat. De kleur der koloniën is meestal vuilgroen, waardoor men ze vrij goed kan herkennen. Door de sterke gasvorming ontstaan vrijwel steeds spleten in de agar. Het is dan ook vaak mogelijk de boekelscheurbacteriën met behulp van deze gistautolysaat-natriumlactaat-agar uit kaas te isoleeren. Bij aanwezigheid van veel andere koloniën, speciaal van die der propionzuurbacteriën, slaagt men hierin echter niet. Een poging werd gedaan om ook hier door verlaging van den pH, die normaal 6,5 bedraagt, den groei der propionzuurbacteriën te onderdrukken. Dit gelukte echter niet. Beneden pH = 5 werd de groei van beide bacteriënsoorten vrijwel gelijkelijkelijk verhinderd.

Resumeerende, achten wij pepton-calciumlactaat met een pH = 4,5 den meest selectieven voedingsbodem voor het isoleeren van boekelscheurbacteriën uit kaas. Daar een pH van 4,5 wel de laagste is, waartoe men kan gaan, is het mogelijk, dat deze pH voor sommige stammen te laag zal zijn. Het is daarom aanbevelenswaardig daarnaast ook cultures aan te leggen in pepton-calciumlactaat pH = 5,5 en gistautolysaat-natriumlactaat-agar. Op deze wijze zullen zij aan de aandacht zeker niet ontsnappen.

Daar boekelscheurbacteriën mogelijk door de gebrekkige onderzoekings-techniek tot nu toe alleen in kaas gevonden werden, zijn alle bij dit onderzoek gebruikte stammen hieruit afkomstig. Hiertoe behoorden zoowel enkele der door BOEKHOUTEN OTT DE VRIES, als in latere jaren en gedurende het huidige onderzoek geïsoleerde stammen.

3. Enkele morphologische kenmerken

Boekelscheurbacteriën zijn korte staafvormige bacteriën, die men gemakkelijk kan herkennen doordat zij dikwijls aan het ééne einde wat toegespitst zijn, waardoor zij een peervormig model hebben. Op de foto's is dit niet altijd even duidelijk (foto 1 en 2). Men ziet ze alleen of in paren en soms in korte kettingen.

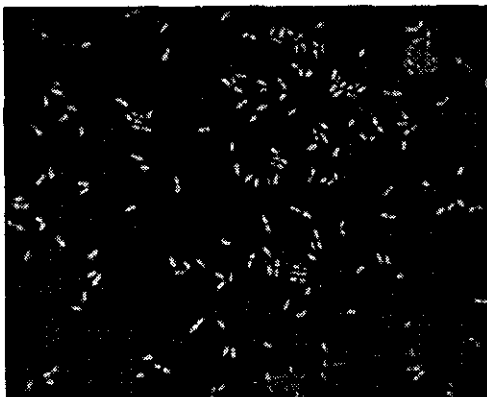


Foto 1. Stam E₁. Nigrosinepraeparaat. Vergr. 1000 ×.

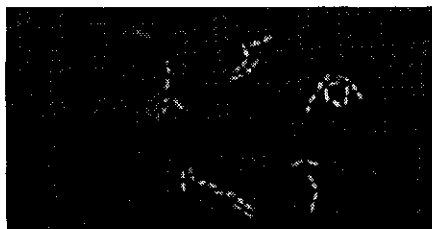


Foto 2. Stam A₅. Nigrosinepraeparaat. Vergr. 1000 ×.

De lengte der cel bedraagt 1,5 à 2,0 μ , de breedte 0,5 à 1,0 μ .

Beweeglijkheid werd nooit waargenomen.

Zij zijn facultatief anaerob, Gram-positief en katalase-negatief; dit laatste in tegenstelling tot de propionzuurbacteriën, die katalase-positief zijn.

Gelatine wordt niet vervloeid en ook melk ondergaat geen verandering.

Voor het bepalen der optimum temperatuur werd de zuurvorming van een aantal stammen in verdunde gistautolysaat ¹⁾ met 1 % glucose pH 5,0 bepaald bij 20°, 30° en 40° C. Dezelfde stammen werden ook geënt in verdunde gistautolysaat + 1 % lactaat pH = 5,3 bij dezelfde 3 temperaturen. Hierbij werd groei en gasspanning genoteerd. Tabel 1 geeft een overzicht der resultaten na 16 dagen kweeken.

¹⁾ Onder verdunde gistautolysaat verstaan wij een mengsel van 1 dl geconcentreerde gistautolysaat + 9 dln gedestilleerd water.

TABEL I

Stam no.	10 ml gistautolysaat + 1 % glucose						10 ml gistautolysaat + 1 % lactaat		
	20°		30°		40°		20°	30°	40°
	groei	titer	groei	titer	groei	titer	groei	groei	groei
4	++	3,2	++	2,2	--	0	++	++	--
12	++	4,3	++	3,8	++	1,0	++	++	++
E.	++	2,7	++	5,0	++	0,9	++	++	++
C ₁	++	1,7	++	3,3	--	0,1	++	++	++
A ₆	++	2,3	++	3,3	++	0,9	++	++	+—
N ₁	++	2,6	++	3,0	++	0,8	++	++	++
ml gas:							5 à 8	10	5 à 8

Hieruit zien we, dat de zuurvorming bij 30° C het hoogste was. In den lactaatbodem was bij die temperatuur de gasvorming het grootste, terwijl dan ook de gisting het snelst verliep. De optimum temperatuur zal dus omstreeks 30° C bedragen, doch ook bij 20° C is de groei nog zeer goed.

Door BOEKHOUT werd voor de doodingstemperatuur een verhitting van 10 minuten tusschen 50° en 55° C opgegeven. Hij verrichtte zijn waarnemingen aan cultures in pepton-calciumlactaat. Met verdunde gistautolysaat-glucose van pH = 6,0 vonden wij hetzelfde resultaat. Slechts stam A₆ kon 10 min. op 55° C verdragen. Deze doodingstemperatuur ligt bijzonder laag. Reeds een zeer milde pasteurisatie zou in staat zijn de kaas-melk van deze bacteriën te bevrijden.

4. De suikervergisting

Dat suikers door boekelscheurbacteriën aangetast kunnen worden, was uit de vroegere onderzoekingen bekend. Soms trad hierbij een even duidelijke gasvorming op als bij de vergisting van lactaat, doch meestal bleef deze achterwege of was zeer gering.

Om na te gaan of misschien de pH van den voedingsbodem al of niet van invloed is op de gasvorming, werd nu door ons een 5-tal stammen in duplo geënt in verdunde gistautolysaat + 1 % glucose op een pH van resp. 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 en 7,0. In alle 60 cultures, die anaerob bij 30° C gekweekt werden, trad groei op. Bij openen der buizen na 16 dagen bleek zich meestal weinig gas te hebben gevormd dat uit CO₂ en H₂ bestond. In één geval was echter zeer veel gas ontstaan. Van een invloed van den begin-pH der cultuurvloeistof op het al of niet optreden der gasvorming was dus niets te merken. De eind-pH, in een 15-tal gevallen met weinig gasvorming bepaald, varieerde van 3,38—3,91.

Een tweede poging om de gasontwikkeling te beïnvloeden had meer succes. Thans werd de cultuurvloeistof door toevoeging van een fosfaatbuffermengsel sterk gebufferd, opdat de pH zoo weinig mogelijk verlopen zou.

Aan verdunde gistautolysaat + $\frac{1}{2}$ % glucose werd 1 % van een mengsel van KH_2PO_4 en $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Sörensen) toegevoegd in een dusdanige verhouding, dat de pH der vloeistof 6,48 bedroeg. Hierin werden de stammen 4, 12, C₁, E₁, A₅ en N₂ in duplo geënt en anaerob bij 30° C gekweekt.

In alle buizen trad na 2 à 3 dagen een voor boekelscheurbacteriën typische gasontwikkeling op, d.w.z. vorming van fijne gasbelletjes, welke meerdere dagen aanhoudt. Bij openen der buizen na 14 dagen bleek veel gas ontstaan te zijn, dat voor de helft uit waterstof bestond. De geur der cultures was de voor boekelscheurbacteriën typische weezoete, aan bouillon herinnerende geur. De eind-pH varieerde tusschen 5,90 en 6,00, zoodat in tegenstelling tot bij de vorige proef slechts een geringe pH-daling opgetreden was.

Uit deze proef bleek dus, dat het mogelijk is ook bij de suikeraantasting sterke gasvorming in de cultures te verkrijgen, mits gezorgd wordt voor een voldoende gebufferd milieu, zoodat de pH niet te laag wordt. We zullen hieronder zien, dat de pH dan in geen geval lager dan 4 mag worden.

Voor de beantwoording van de vraag welke suikers door de boekelscheurbacteriën worden vergist, behoeft dus geen onderscheid gemaakt te worden tusschen groei met en groei zonder zichtbare gasvorming. *In alle gevallen, waarin met een suiker groei optrad, kon door sterker bufferen der cultuurvloeistof altijd een zichtbare gasvorming worden bewerkstelligd.* Het zal duidelijk zijn, dat door onbekendheid met deze voor de gasvorming noodzakelijke buffering in de vroegere onderzoekingen het optreden van een zichtbare gisting van het toeval afhankelijk was.

Het al of niet vergisten van verschillende suikers werd nagegaan door te enten in verdunde gistautolysaat met 0,4 % der suiker en 1 % fosphaat (pH = 6 à 6,5). De enting geschiedde in duplo en de kweeking anaerob bij 30° C. Tabel 2 geeft een overzicht der resultaten.

TABEL 2

Vergisting van suikers door boekelscheurbacteriën

Stam no.	Glucose	Fructose	Galactose	Mannose	Saccharose	Lactose	Maltose	Raffinose	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Glycerine	Sorbit	Manniet	Zetmeel	Dextrine	Salicine	Inuline	Dulciet
4	+	+	+	+	—	—	(—)	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—
12	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	+	(—)	—	—	—	—	—
E ₁	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
C ₁	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
A ₅	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—
N ₂	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	—	—	—	—	—

In overeenstemming met de vroegere waarnemingen vonden wij dus ook, dat de monosen alle goed vergist worden. De meeste stammen vergisten bovendien maltose, rhamnose en de polyalcoholen sorbiet en manniet. Slechts de stam A₅ is een uitzondering en tast ook lactose, saccharose en raffinose aan.

Bij polysacchariden en polyalcoholen treedt de zichtbare gasvorming gemakkelijker op dan bij de monosen. Bij de polyalcoholen is tevens de hoeveelheid ontwikkeld gas nog grooter, hoewel ook hier de verhouding van H_2 en CO_2 1 : 1 is.

Zoals reeds in den aanvang werd gezegd, kunnen de suikers ook aangetast worden zonder dat er gasvorming optreedt. Het medium wordt dan sterk zuur; de pH daalt beneden 4. De vraag was nu welk zuur bij deze dissimilatie ontstaat. Volgens de vroegeré onderzoekingen ontstond een niet-vluchtig zuur, waarvan optisch actieve zinkzouten konden worden bereid, doch dit zuur was geen melkzuur. Aanvankelijk werd daarom naar andere organische zuren gezocht.

De stammen C_1 en A_5 werden daartoe geënt in 2 l verdunde gistautolysaat met 1 % glucose, dus een niet gebufferde voedingsvloeistof, waarvan de pH 6,0 bedroeg. Na enkele weken werd met de verwerking begonnen. De pH bedroeg voor A_5 toen 3,65, voor C_1 3,88.

Na neerslaan der eiwitten met phosphorwolframzuur en H_2SO_4 werd de vloeistof ingedampt tot een klein volume. Dit werd opgenomen in anhydrisch Na_2SO_4 en geëxtraheerd met droge aether. Na afdampen der aether bleef een zure, strooperige vloeistof over, welke gemakkelijk in water oploste. Reacties op verschillende, mogelijk aanwezige, organische zuren vielen negatief uit, doch toen ten slotte ook op melkzuur gereageerd werd, verkregen we een sterk positieven uitslag. Toegepast werden de reactie van Denigés, waarbij na verhitten met gec. H_2SO_4 en bekoelen 2 druppels van een 5 %-ige alcoholische guajacoloplossing werden toegevoegd (fuchsinerode kleur) en die van Fletcher en Hopkins, waarbij na bekoelen der met gec. H_2SO_4 en $CuSO_4$ verhitte oplossing 2 à 3 druppels van een $\frac{1}{2}$ %-ige alcoholische thiopheenoplossing werden toegevoegd, waarna bij verwarmen de typische kersroode verkleuring optrad.

Door koken met $ZnCO_3$ werd nu het zinkzout bereid, waarvan na omkristalliseeren het kristalwatergehalte en het zinkoxydgehalte bepaald werd. Het resultaat was als volgt:

	C_1	A_5
kristalwatergehalte	18,22 %	18,24 %
zinkoxydgehalte	33,35 %	33,50 %

Daar het Zn-zout van inactief melkzuur 18,2 % kristalwater en 33,42 % ZnO bevat, was dus hiermede aangetoond, dat beide stammen *inactief melkzuur* vormen.

Dat de boekelscheurbacteriën uit suikers melkzuur vormen zou meteen het feit verklaren, dat onder gunstige omstandigheden bij de suikeraan-tasting tevens een gasvorming optreden kan. De boekelscheurbacteriën zijn immers in staat lactaten om te zetten en we weten, dat dit met gasvorming gepaard gaat. We zouden dan moeten aannemen, dat zij onder bepaalde pH-voorwaarden het door henzelf gevormde melkzuur wederom vergisten.

Alvorens wij deze kwestie nader onder oogen zien, dienen wij eerst de uit technisch oogpunt zoo belangrijke lactaatvergisting te bespreken.

5. De vergisting van lactaten

Uit zuiveloogpunt bezien, is de vergisting van lactaten de belangrijkste eigenschap der boekelscheurbacteriën. Immers bij deze omzetting worden gasvormige producten gevormd, kooldioxyde en waterstof, die in kaas de vorming van gaten of scheuren tengevolge kunnen hebben.

De omzetting van lactaten is een slechts langzaam verlopend proces. Het was voor de bestudeering van de lactaatvergisting door de boekelscheurbacteriën daarom gewenscht na te gaan onder welke omstandigheden deze het beste plaats vindt.

Tot dit doel was het noodzakelijk een betrouwbare bepalingsmethode voor melkzuur te bezitten. De methode van FRIEDEMANN (5), waarbij het melkzuur door KMnO_4 in zuur milieu tot acetaldehyde geoxydeerd wordt, welk acetaldehyde vervolgens overgedestilleerd wordt, opgevangen in NaHSO_3 en met jodium getitreerd, bleek betrouwbare resultaten te geven. De uitvoering geschiedde als volgt.

In een platbodenkolf van 300 ml, voorzien van druppeltrechter en spatbol, wordt 40 ml der te onderzoeken vloeistof, 40 ml 0,3 molair H_3PO_4 , 40 ml 10 % $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ en een mespunt talkpoeder gebracht. De spatbol is door een aflopende buis in verbinding gebracht met het bovineinde van een verticalen koeler, waarvan het benedaneinde steekt door een dubbeldoorboorde rubberstop tot den bodem van een platbodenkolf van 200 ml, voorzien van een merkstreep op ± 80 ml. De tweede opening in de rubberstop dient als verbinding met de buitenlucht.

In het kolfje van 200 ml wordt ongeveer 30 ml 0,5 % NaHSO_3 -oplossing gebracht. Daar de sterkte der NaHSO_3 -oplossing in verloop van tijd afneemt, neme men liever een geconcentreerde oplossing, waarvan men het gehalte af en toe bepaalt, en verdunt deze tot 30 ml. Zoo gebruikten wij meestal 3 ml 5 % NaHSO_3 -oplossing verdund tot 30 ml.

In den druppeltrechter brengt men 60 ml $\pm 0,05$ n. KMnO_4 -oplossing. De inhoud der eerste kolf wordt in 5 minuten aan de kook gebracht. Als de damp in den koeler begint te condenseeren, laat men de KMnO_4 -oplossing bijdruppelen met zoo'n snelheid, dat de vloeistof in de kolf steeds bruin of roodbruin blijft. Men destilleert in ongeveer 15 minuten 50 ml over en verwijderd de ontvangkolf na den koeler met gedestilleerd water te hebben nagespeld. Tot dit doel plaatst men den koeler een weinig hooger.

Men voegt nu 2 ml stijfseeloplossing toe. Deze wordt bereid door een mengsel van 5 g oplosbaar zetmeel met 10 mg HgJ_2 en 30 ml water te voegen bij 1 l kokend water en 3 minuten door te koken. Vervolgens wordt een sterke jodiumoplossing, bestaande uit ongeveer 20 g J_2 en 37,5 g KJ per l, tot geringe overmaat toegevoegd. Deze overmaat wordt onmiddellijk weggenomen met $\pm 0,1$ n. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oplossing, waarna uit een buret gestelde 0,1 n. J_2 wordt toegevoegd tot zwak blauwe kleur. Alle sulfiet is nu geoxydeerd behalve dat, waaraan de hoeveelheid aldehyde, die wij bepalen willen, gebonden is. Deze wordt in vrijheid

TABEL 3

Ontleding van natriumlactaat

Stam no.	E_1								
	4,65			5,55			6,65		
Begin-pH									
Aantal dagen	2	8	16	1	8	16	5	11	19
pH	6,20	7,56	7,88	6,33	7,63	7,82	6,85	7,65	7,66
g/l omgezet Mz	1,10	3,19	3,51	0,62	2,83	5,02	0,56	1,70	2,42
% omgezet Mz	12,7	36,9	40,6	7,5	34,1	60,4	7,4	22,5	32,1
mg/l gevormd Az	427	961	1168	227	944	2024	342	657	759
mol Az)	0,58	0,45	0,50	0,55	0,50	0,60	0,91	0,58	0,47
mol Mz)									

gesteld met 15 ml verzadigde NaHCO_3 -oplossing en met 0,1 n. J_2 getitreerd. De reactie gaat vrij langzaam. Wanneer de reactie zeer langzaam wordt, voegt men nog 1 ml 10 % Na_2CO_3 -oplossing toe en titreert tot het eindpunt. De zwak blauwe kleur moet minstens $\frac{1}{2}$ minuut blijven bestaan. Door nog eens toevoegen van 1 ml 10 % Na_2CO_3 -oplossing wordt nagegaan of al het sulfiet werkelijk in vrijheid is gesteld. Zoo noodig wordt dan nog verder getitreerd. Het eindpunt was altijd zeer goed te bepalen.

Als x = aantal ml 0,1 n. J_2 , gebruikt voor het gebonden sulfiet (dus verschil 1e en 2e eindpunt), dan is de hoeveelheid melkzuur, die in de kolf aanwezig was $x \times 4,5$ mg.

Ter controle werd de bepaling uitgevoerd met zuiver zinklactaat. Teruggevonden werd bij 10 bepalingen 95—97 %.

Sterke fosfaatconcentraties, die in den gebufferden voedingsbodem gebruikt werden, hadden op de bepalingen geen invloed.

Bij den voedingsbodem, bestaande uit verdunde gistautolysaat als N-bron. behoefde niet onteiwit te worden; 10 ml van dezen bodem, die ongeveer 100 mg melkzuur bevatten, werden na verdunning tot 40 ml voor de bepaling gebruikt. Bij sterk eiwithoudende vloeistoffen werd met phosphorwolfranzuur onteiwit. Hierna moet dan eerst geneutraliseerd worden. Het toe te voegen phosphorzuur brengt den pH dan op ± 2 , hetgeen de gewenschte zuurgraad voor de bepaling is.

Bij aanwezigheid van suiker werd ontsuikerd met CuSO_4 en kalkmelk. Zoowel door onteiwitten als ontsuikeren valt de bepaling een weinig lager uit.

Behalve melkzuur werd in de nu volgende onderzoeken ook het vluchtig zuur bepaald (6) en de pH electrometrisch met de chinhydronelectrode gemeten.

Aangezien reïnculturen bij pH 4,5 van de lactaatvloeistof een bijzonder krachtige gisting vertoonden, werd aan de mogelijkheid gedacht, dat ook de volledigheid der omzetting afhankelijk zou zijn van den begin-pH van het medium. Daarom werden de stammen E₁, 12 en A₅ geënt in verdunde gistautolysaat met 1 % natriumlactaat. Deze bevond zich in platbodemkolven, die tot in den hals met vloeistof gevuld werden, terwijl ter afsluiting van de lucht op de vloeistof een laag steriele paraffineolie aangebracht werd. De enting geschiedde met $\frac{1}{3}$ %, de kolven werden bij 30° C geplaatst en van tijd tot tijd werden met steriele pipetten monsters genomen. Deze proef werd bij 3 verschillende pH's, n.l. 4,65, 5,55 en 6,65 uitgevoerd. De resultaten der analyses zijn vereenigd in tabel 3.

Het melkzuurgehalte der voedingsbodems bedroeg aan het begin der proef bij pH 4,65: 8,65 g/l, bij pH 5,55: 8,31 g/l en bij pH 6,65: 7,55 g/l, het azijnzuurgehalte resp. 338, 385 en 300 mg/l.

Onder het aantal dagen, dat in deze tabel opgegeven is, wordt verstaan het aantal dagen na het begin der gisting in de kolf, welke gisting meestal 3 dagen na het inzetten der proef aanving.

bij verschillende pH

12																	
4,65			5,55			6,65			A ₅								
2	7	15	2	8	16	4	8	18	4,65			5,55			6,65		
									4	8	18	5	9	18	5	11	19
5,73	6,99	7,63	6,34	7,23	7,47	6,96	6,96	7,80	6,51	7,29	7,67	6,67	7,49	7,78	6,83	7,47	7,79
1,35	3,29	3,63	0,62	2,10	2,91	0,46	1,28	1,82	1,96	3,24	4,73	1,82	2,94	4,07	1,12	2,41	3,60
15,6	38,0	42,0	7,5	25,3	35,0	6,1	17,0	24,1	22,7	37,5	54,7	21,9	35,4	49,0	14,8	31,9	47,7
499	961	—	254	746	1103	342	579	888	979	1537	620	929	1433	537	1020	1608	
0,56	0,44	—	0,61	0,54	0,57	1,13	0,68	0,73	0,50	0,45	0,49	0,51	0,47	0,53	0,72	0,64	0,67

Over het algemeen zien we, dat de omzetting tot een iets grooter percentage plaats vindt, bij een lageren begin-pH. Een uitzondering vormt E₁, welke bij pH 4,65 in 16 dagen tijds minder omzet dan bij pH 5,55. Op zijn hoogst werd binnen het tijdsverloop der proef 60 % omgezet.

Als vluchtig zuur werd slechts azijnzuur gevonden. De hoeveelheid hiervan nam regelmatig toe en blijktbaar evenredig met de omzetting van het melkzuur. In den laatsten regel werd de moleculaire verhouding van gevormd azijnzuur tot omgezet melkzuur berekend. Zij wijkt vooral bij pH 4,65 en 5,55 slechts weinig van 0,5 af, hetgeen mogelijk op een eenvoudig verband tusschen de azijnzuurproductie en de melkzuuromzetting zou kunnen wijzen.

Daar bij de vorige proef gebleken was, dat de pH der voedingsvloeistof snel tot een nog al hooge waarde stijgt, en wij dit voor de volledigheid der omzetting niet gunstig achten, werd in een volgende proef de pH der voedingsvloeistof door een sterkere buffering binnen nauwere grenzen gehouden.

Gebruik werd gemaakt van de stammen E₁ en A₅. Zij werden op dezelfde wijze als hierboven beschreven is geënt in kolven met verdunde gist-autolysaat + 1 % natriumlactaat, waarin mengsels van KH₂PO₄ en Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Sörensen) waren opgelost in zulke hoeveelheden, dat de fosphaatconcentraties resp 0,1, 0,5, 1, 2 en 5 % bedroegen en de pH omstreeks 5 kwam te liggen. Bij nauwkeurige meting van den pH na de sterilisatie der vloeistoffen was deze in de opgegeven volgorde resp. 5,14, 5,10, 5,09, 5,08 en 5,04. Het melkzuurgehalte in dezelfde volgorde bedroeg 8,07, 8,15, 8,18, 8,05 en 8,07 g per l. De gisting trad in alle kolven na 2 dagen op. De resultaten der analyses zijn vereenigd in tabel 4.

TABEL 4
Ontleding van natriumlactaat in gebufferde voedingsvloeistof.

Na begin der gisting	10 dagen					20 dagen;				30 dagen		
	0,1	0,5	1	2	5	0,1	0,5	2	5	0,1	2	5
Phosphaatconcentr.												
Stam A ₅												
pH	6,55	6,40	6,20	5,86	5,52	7,61	7,01	6,28	5,90	7,27	6,36	5,89
Omgezet Mz in g/l	2,49	3,21	3,34	2,61	3,12	4,29	6,21	6,04	7,49	5,77	7,74	7,95
Omgezet Mz in %	30,8	39,4	41,0	30,9	38,6	53,1	76,2	75,1	92,8	2868	2290	2369
Gevormd Az in mg/l	—	—	—	—	—	—	0,63	—	—	0,75	0,45	0,45
Mol Az	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mol Mz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Stam E ₁												
pH	6,68	6,34	6,28	5,90	5,49	7,13	6,66	6,26	5,87	7,50	6,33	5,91
Omgezet Mz in g/l	2,43	2,82	3,41	3,21	3,23	5,44	4,23	6,09	6,95	6,38	7,67	7,92
Omgezet Mz in %	30,1	34,6	41,9	39,9	40,0	67,4	51,8	75,5	86,2	4514	2576	2273
Gevormd Az in mg/l	—	—	—	—	—	—	0,41	—	—	1,06	0,50	0,43
Mol Az	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Mol Mz	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Uit de tabel is het duidelijk, dat vooral na verloop van tijd de fosfaatconcentratie van belang begint te worden. Na 10 dagen is er nog geen sprake van eenigen invloed, na 20 en 30 dagen is het echter zeer duidelijk, dat een hogere fosfaatconcentratie een vollediger omzetting bevordert. Inderdaad heeft dus het verhinderen van een te sterke pH-verhooging gunstigen invloed op de omzetting van het melkzuur gehad.

Bij onze verdere proeven werd daarom aan den voedingsbodem meestal $\frac{1}{2}$ of 1 % fosfaatbuffer toegevoegd.

De moleculaire verhouding tusschen gevormd azijnzuur en omgezet melkzuur was meestal weer omstreeks 0,5, doch week hiervan in sommige gevallen niet onbelangrijk af.

Bij een vijftal andere stammen werd in verdunde gistautolysaat met 1 % natriumlactaat en 1 % fosfaatbuffer, waarvan de pH 5,12 bedroeg, het percentage omgezet melkzuur en de pH na 30 dagen bij 30° C bepaald. Het resultaat was:

Stam	4	12	E ₂	C ₄	N ₂
pH	6,50	6,48	6,52	6,44	6,61
Omgezet melkzuur in %	72,5	65,4	66,2	91,4	82,5

Ook hier zien we weer hoe traag de melkzuurvergisting verloopt. Men zou nu kunnen denken, dat, aangezien melkzuur een optisch actieve verbinding is, één der vormen aanmerkelijk moeilijker aantastbaar zou zijn dan de andere. Door inleiden van H₂S in de koud verzadigde oplossingen van Zn-d-lactaat en Zn-l-lactaat werden de respectievelijke optisch actieve zuren bereid. Van de door neutralisatie met natronloog verkregen natriumzouten van l- en d-melkzuur werd 1 % toegevoegd aan verdunde gistautolysaat met 1 % fosfaatbuffer. De pH van deze voedingsbodems bedroeg \pm 5,5. Hierin entten wij de stammen 1, 4, 12, A₃, C₁, C₄, E₁, E₂, E₄ en N₂. In beide bodems trad een goede groei en gasvorming op.

Blijkbaar bezitten dus de boekelscheurbacteriën geen voorkeur voor de zouten van d- of l-melkzuur en kan de langzame vergisting van inactief natriumlactaat niet op rekening geschoven worden van een moeilijk vergisten van een der optisch actieve componenten.

6. De gistingsproducten bij de lactaatvergisting

Het bij de lactaatvergisting gevormde gas bestaat uit koolzuur en waterstof. Verder ontstaat een hoeveelheid vluchtig zuur, dat, zoo niet geheel, dan toch voor het grootste gedeelte azijnzuur is. Het kwam ons gewenscht voor nog eens nauwkeurig na te gaan of zich onder het gevormde vluchtig zuur ook propionzuur bevindt. Tot dit doel werd een aantal boekelscheurbacteriën anaerob bij 30° C gekweekt in 400 ml peptonnatriumlactaat. Na 14 dagen werd hiervan 1 l stoomdestillaat gemaakt, hetwelk na neutraliseeren tot 100 ml werd ingedampt en na toevoegen van 10 ml n/l H₂SO₄ met de destillatiemethode werd bepaald. Gevonden werd

Stam no.	Begin-pH 6,0 Eind-pH:	mg per l	
		azijnzuur	propionzuur
4	6,77	748	131
12	6,52	425	0
A ₃	6,65	873	0
C ₁	6,66	432	0
E ₂	7,07	234	14

Het is duidelijk, dat propionzuur hoogstens in sporen voorkomt, hetgeen ook in latere bepalingen steeds bevestigd werd.

Overeenkomstig reeds vermelde proeven is ook hier de pH van den voedingsbodem door de omzetting van lactaat gestegen.

Zijn de hiergenoemde stoffen, azijnzuur, CO₂ en waterstof nu de eenige gistingsproducten? Om dit na te gaan werden eenige koolstofbalansen gemaakt. De hiertoe genomen proeven werden uitgevoerd in een eenigszins gewijzigd toestel volgens BERNHAUER (7).

Dit bestond uit een gistingskolfje van \pm 300 ml, dat tot in den hals met geënte voedingsvloeistof gevuld werd, voorzien van rubberstop met een tot op den bodem reikende inleidbuis, waarmee door een wattenfilter gesteriliseerd CO₂ ingeleid kon worden en een capillaire afvoerbuis, voorzien van een geslepen kraan; deze afvoer buis kwam uit in een ontvanger, welke geheel gevuld was met door CO₂ verzadigd water, dat door middel van een, via een slang communiceerende flesch hooger of lager gesteld kon worden. Het eveneens met CO₂ verzadigde water in de flesch werd afgedekt met een laag paraffine-olie om verlies van het CO₂ te voorkomen. De gasontvanger was aan de bovenzijde voorzien van een glazen kraan voor het aftappen van het gevormde gistingsgas. Bij open kraan en hoogen stand van de communiceerende flesch werd na de enting en plaatsing van het geheele toestel bij 30° C eenige uren een stroom CO₂ door de voedingsvloeistof en den ontvanger geleid, zoodat alle lucht verdreven was en de vloeistoffen bij de proeftemperatuur met CO₂ verzadigd waren. Nu werd de kraan in de afvoerbuis gesloten, de zich in den ontvanger eventueel bevindende CO₂ uitgedreven door hooger stellen der flesch, de kraan van den ontvanger gesloten en de flesch laag gesteld. Tevens werd de inleidbuis van de gistingskolf dichtgeklemd. Hierna werd de kraan van de afvoercapillair voorzichtig geopend.

Eventueel zich in den ontvanger gedurende den eersten dag vormend gas, hetgeen bij onze proeven steeds een onbeduidende hoeveelheid bleek te zijn, is te wijten aan oververzadiging der vloeistof met CO₂ en kan worden afgelaten. De gisting treedt eerst na 1½ à 2 dagen bij 30° C op. Het zich ontwikkelende gistingsgas verzamelt zich boven in den ontvangencylinder en werd door een capillair afgetapt in een met CO₂ verzadigd water gevulde buret. Tot dit doel werd de capillairkraan gesloten en de flesch in zoo'n hoogen stand gebracht, dat het gas uit den ontvanger gedreven werd, waarna de oorspronkelijke toestand werd hersteld.

De analyse van het gevormde gas geschiedde met Hempel-pipetten, waarbij voor de bepaling der waterstof een explosiepipet werd gebruikt.

De voedingsvloeistof bestond uit verdunde gistautolysaat met 1 % natriumlactaat, gebufferd met 0,96 % KH₂PO₄ en 0,04 % Na₂HPO₄ · 2 H₂O (Sörensen). Er werd een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid gebruikt. De enting geschiedde met 1 ml cultuur van den betreffenden bacteriestam.

De onderdeelen van het gistingskolpje waren gesteriliseerd en onder groote voorzorg in elkander gezet.

Zoowel aan het begin der proef als na afloop der gisting werden het melkzuurgehalte, het azijnzuurgehalte en de pH bepaald. Het verzamelde gas werd af en toe afgetapt en geanalyseerd. De hoeveelheden gas werden opgegeven in ml bij 20° C en 76 cm.

Alle gevonden waarden werden uitgerekend in mg per l, terwijl ook de koolstofbalans in mg C per l werd uitgedrukt.

De tabellen 5, 6 en 7 geven een overzicht van de resultaten bij een drietal proeven.

TABEL 5

Analyse der gistingsproducten van stam E₁

Vloeistofvolume = 330 ml	pH	mg/l		mol. Az mol. Mz
		Mz	Az	
Begin	5,19	6908	309	
Einde	6,27	4561	936	
mg/l		2347	627	0,40
Gasanalyse	ml gas	ml CO ₂	ml H ₂	Verhouding ml CO ₂ ml H ₂
na 5 dagen	101,2	65,6	28,1	2,34
" 7 "	63,6	34,0	26,4	1,29
" 10 "	52,3	25,3	25,0	1,01
" 16 "	58,4	26,2	30,1	0,87
" 22 "	27,0	10,0	15,1	0,66
Totaal	302,5	161,1	124,7	1,29
In mg/l		901	32	

Balans: 2347 mg Mz → 627 mg Az + 901 mg CO₂ + 32 mg H₂.

Koolstofbalans: 939 mg C_{Mz} → 251 mg C_{Az} + 246 mg C_{CO₂} = 497 mg C.

TABEL 6

Analyse der gistingsproducten van stam A₅

Vloeistofvolume = 370 ml	pH	mg/l		mol. Az mol. Mz
		Mz	Az	
Begin	5,41	7428	969	
Einde	6,00	5680	250	
mg/l		1748	719	0,62

Gasanalyse	ml gas	ml CO ₂	ml H ₂	Verhouding $\frac{\text{ml CO}_2}{\text{ml H}_2}$
na 4 dagen	85,1	44,5	28,0	1,59
" 6 "	76,2	34,8	38,4	0,91
" 10 "	53,3	22,4	28,8	0,78
" 15 "	36,2	14,1	20,9	0,68
Totaal	250,8	115,8	116,1	1,00
In mg/l		577	26	

Balans: 1748 mg Mz → 719 mg Az + 577 mg CO₂ + 26 mg H₂.

Koolstofbalans: 699 mg C_{Mz} → 288 mg C_{Az} + 157 mg C_{CO₂} = 445 mg C.

TABEL 7

Analyse der gistingproducten van stam 12

Vloeistofvolume = 370 ml	pH	mg/l		$\frac{\text{mol. Az}}{\text{mol. Mz}}$
		Mz	Az	
Begin	5,42	7821	327	
Einde	6,18	4061	1794	
mg/l		3760	1467	0,58

Gasanalyse	ml gas	ml CO ₂	ml H ₂	Verhouding $\frac{\text{ml CO}_2}{\text{ml H}_2}$
na 3 dagen	109,7	84,1	15,4	5,45
" 4 "	86,5	53,3	32,1	1,66
" 6 "	123,7	67,6	52,5	1,29
" 9 "	99,5	46,6	50,0	0,93
" 13 "	85,4	33,7	41,7	0,81
" 20 "	64,7	26,4	36,3	0,73
Totaal	569,5	311,7	228,0	1,37
In mg/l		1554	52	

Balans: 3760 mg Mz → 1467 mg Az + 1554 mg CO₂ + 52 mg H₂.

Koolstofbalans: 1504 mg C_{Mz} → 587 mg C_{Az} + 424 mg C_{CO₂} = 1011 mg C.

Ook in deze proeven is de verhouding van de moleculaire hoeveelheden omgezet melkzuur en gevormd azijnzuur niet ver van 0,5 gelegen.

Wat verder de aandacht trekt, is dat de verhouding van de gevormde hoeveelheden CO₂ en H₂ zich gedurende het verloop van de proef sterk wijzigt. Voor de gegevens van tabel 5 is dit nog eens grafisch voorgesteld in fig. 1.

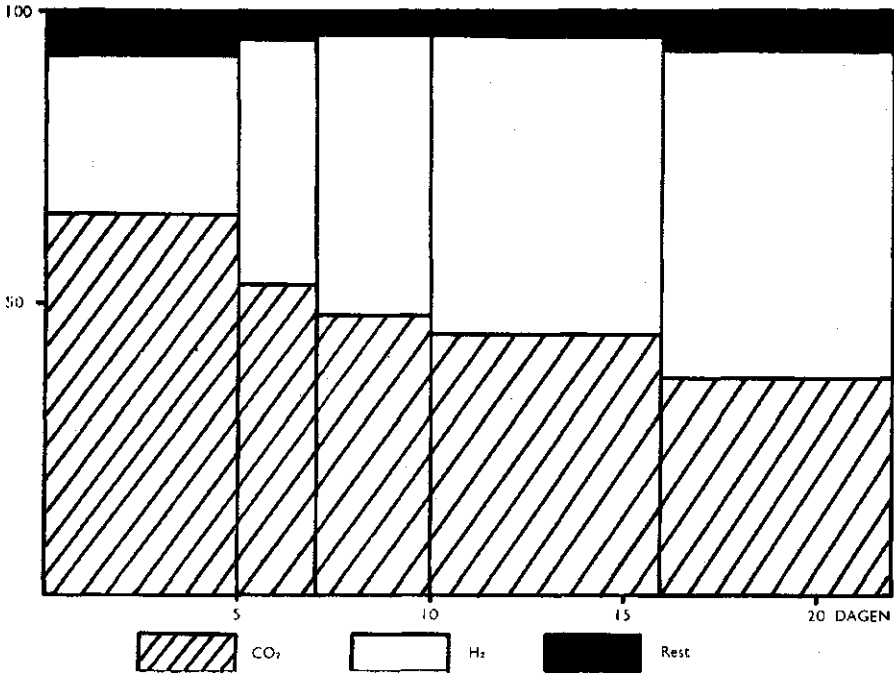


Fig. 1. Percentage CO₂ en H₂ in het gistingsgas bij de proef van tabel 5.

Uit de koolstofbalansen bleek duidelijk, dat er door de boekelscheur-bacteriën uit lactaat nog andere gistingsproducten dan azijnzuur, koolzuur en waterstof gevormd worden. In alle 3 gevallen werd een belangrijk tekort gevonden.

Er moet dus behalve de bovengenoemde gistingsproducten nog een stof gevormd worden, die koolstof in het molecule bevat. Na eenig zoeken bleek dit aethylalcohol te zijn.

Wanneer eenige liters uitgegiste cultuurvloeistof onteiwit werden met phosphorwolframzuur en zwavelzuur en vervolgens na neutralisatie werden geredificeerd, kwam bij 78° C een kleine hoeveelheid aethylalcohol over. Aanvankelijk werd als voedingsvloeistof verdunde gistautolysaat + 1 % natriumlactaat en ½ % fosphaatbuffer gebruikt, doch het gistautolysaat zelf is niet alcoholvrij. Hoewel het verschil met de blanco zeer goed te constateeren was, werd naderhand pepton-calciumlactaat en pepton-natriumlactaat gebruikt. Ook hierbij werd de vorming van aethylalcohol aangetoond.

Voor het opstellen van nieuwe koolstofbalansen was dus een quantitative bepalingsmethode van aethylalcohol noodig. Wij verkregen bevredigende resultaten met die van FRIEDEMANN en KLAAS (8), mits, zooals ook aangegeven wordt, toestel en glaswerk uiterst nauwkeurig gereinigd werden van organische stof. Voor de bereiding van de te gebruiken vloeistoffen

werd gedestilleerd water gebruikt, dat in een met kaliumbichromaat-zwavelzuur-mengsel gereinigd toestel van KMnO_4 was afgedestilleerd.

Alvorens de bepaling definitief uit te voeren, moet eerst met eenige proefbepalingen het alcoholgehalte ongeveer bepaald worden. Het te nemen monster mag n.l. niet meer dan 0,5 mg alcohol bevatten.

De uitvoering is nu als volgt.

Het monster wordt in een Kjeldahldestructiekolf van 300 ml gebracht en aangevuld met gedestilleerd water tot 50 à 60 ml. Hieraan wordt toegevoegd: 5 ml 10 % Natriumwolframaatoplossing, 5 ml HgSO_4 -oplossing, welke bereid wordt door 100 g HgSO_4 op te lossen in 500 ml gedestilleerd water met 56 ml gec. H_2SO_4 en aan te vullen tot 1 l, en een mespunt talkpoeder.

Na goed rondschudden wordt de kolf aangesloten aan een tweemaal recht-hoekig gebogen buis, die aan het andere einde in verbinding staat met het bovineinde van een verticalen koeler. Het ondereinde van dezen koeler steekt in het ontvangkolfje (150 ml platbodem), waarvan de monding door een glazen kap beschermd is voor het invallen van stofdeeltjes.

De vloeistof wordt nu langzaam aan de kook gebracht en in 15 à 20 minuten wordt 30—35 ml overgedestilleerd.

Aan het destillaat of een aliquot deel hiervan, aangevuld met gedestilleerd water tot 30 à 35 ml, wordt nu 10 ml 5 normaal NaOH en 25 ml $\pm 0,02$ normaal KMnO_4 onder schudden toegevoegd. (Deze laatste wordt door verdunnen met gedestilleerd water uit nauwkeurig gestelde 0,1 normaal oplossing bereid). Over het kolfje wordt een bekerglaasje geplaatst om het invallen van stof te verhinderen, waarna men 20 minuten in een kokend waterbad verhit. (Bij aanwezigheid van aethylalcohol treedt langzamerhand een groene kleur op). Na afkoelen in stroomend water wordt 10 ml 10 norm. H_2SO_4 toegevoegd, opnieuw afgekoeld en 0,2—0,5 g KJ-kristallen in de vloeistof gebracht. Het vrijkomende Jodium wordt met 0,02 normaal Natriumthiosulfaat (versch bereid uit gestelde 0,1 normaal oplossing) getitreerd, waarbij aan het einde 1 à 2 ml stijfse oplossing toegevoegd worden.

Voor een blanco bepaling gaat men uit van 30—35 ml gedestilleerd water en behandelt dit als de bepaling.

Is C het verschil in ml 0,02 norm. thiosulfaat tusschen blanco en bepaling, dan is de hoeveelheid alcohol in de voor de bepaling gebruikte hoeveelheid destillaat $C \times 0,0855$ mg, mits C niet grooter dan 6 ml is, waarvoor men door het monster juist te kiezen zorgen kan.

De volledige koolstofbalansen werden nu geheel op dezelfde wijze, als vroeger besproken werd, met behulp van het toestel van BERNHAUER bepaald. Ook nu constateerden wij weer de typische afname van het percentage CO_2 en toename van het percentage H_2 in het gasmengsel. Korthedshalve vermelden we in tabel 8 alleen de totale resultaten.

TABEL 8

Hoeveelheid gistingsproducten, gevormd uit melkzuur

Stam no.	pH		mg per l				
	Begin	Einde	omgezet Mz	gevormd			
				Az	Alc.	CO_2	H_2
E_1 . . .	5,59	6,15	2684	757	728	1341	36
A_2 . . .	5,51	6,28	3733	846	990	1849	48
N_2 . . .	5,51	6,30	3725	1026	980	1777	—

In tabel 9 is het aantal mg koolstof per l, dat in de omgezette of gevormde producten aanwezig is, benevens de som van die der gevormde producten, berekend.

TABEL 9

Koolstofbalansen der lactaatvergisting

Stam no.	mg C per l in				
	Mz	Az	Ale.	CO ₂	Az + Ale. + CO ₂
E ₁	1074	303	380	366	1049
A ₅	1493	338	517	504	1359
N ₂	1490	410	511	485	1406

Gezien de niet te vermijden bepalingsfouten bij de verschillende producten, kunnen we zeggen, dat behoudens sporen andere verbindingen, waaronder in elk geval bij sommige stammen propionzuur voorkomt, **de boekelscheurbacteriën uit lactaten dus: azijnzuur, aethylalcohol, kool-dioxyde en waterstof vormen.**

Ter illustratie van het groote verschil met propionzuurbacteriën verrichtten wij ook een complete analyse met een uit kaas geïsoleerde propionzuurbacterie. Wij vonden dat uit 6540 mg melkzuur gevormd werd 1995 mg azijnzuur + 3171 mg propionzuur + 761 mg CO₂.

De koolstofbalans hieruit berekend luidde:

$$2616 \text{ mg } C_{Mz} \rightarrow 798 \text{ mg } C_{Az} + 1542 \text{ mg } C_{Pz} + 208 \text{ mg } C_{CO_2} = 2548 \text{ mg } C$$

Wij kunnen nu nog de vraag stellen op welke wijze de lactaten afgebroken worden. Wanneer dit volgens een eenvoudig schema geschiedt, zouden de gistingproducten in een vaste verhouding tot elkaar gevormd worden. Dat dit niet zoo is bleek reeds bij de verhouding van kooldioxyde en waterstof, welke gedurende de gisting niet onbelangrijk verschuift.

Berekenen we uit tabel 8 de moleculaire verhoudingen, dan vinden we de in tabel 10 gegeven getallen.

TABEL 10

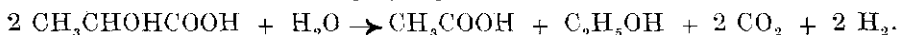
Stam no.	mol. gevormd per mol. omgezet Mz			
	Az	Ale.	CO ₂	H ₂
E ₁	0,423	0,531	1,022	0,603
A ₅	0,340	0,519	1,013	0,580
N ₂	0,413	0,515	0,976	—

Verrichten we hetzelfde bij de resultaten van de tabellen 5, 6 en 7, waarbij dus geen alcohol bepaald werd, dan vinden we uitkomsten, zooals in tabel 11 zijn weergegeven.

TABEL 11

Stam no.	mol. gevormd per mol. omgezet Mz		
	Az	CO ₂	H ₂
12	0,585	0,845	0,622
E ₁	0,400	0,785	0,614
A ₃	0,617	0,675	0,669

We zien dus in alle gevormde stoffen geen constante verhoudingen, ja zelfs bij denzelfden stam zien we niet onbelangrijke verschillen. Volgens een eenvoudig schema zal de afbraak dus niet verlopen. Wil men zich echter een eenvoudige voorstelling maken, dan komen de gevonden cijfers het beste overeen met de vergelijking:



Hierbij valt op te merken, dat vooral de gevonden hoeveelheid waterstof geringer is dan theoretisch te verwachten is. Een verklaring hiervoor is in tweeërlei opzicht te geven. In de eerste plaats wordt soms ook een weinig propionzuur gevonden, dat door reductie van melkzuur kan zijn gevormd. Wanneer een gedeelte van het melkzuur aan de reactie volgens bovenstaande vergelijking wordt onttrokken, is het verklaarbaar, dat de koolstofbalans steeds nog een gering tekort aanwijst. Bovendien zal de hoeveelheid gevormd azijnzuur dan geringer moeten zijn dan theoretisch te verwachten is. Vooral bij de cijfers van tabel 10 der latere meest betrouwbare bepalingen komt dit duidelijk tot uiting. Des te opvallender is het, dat het alcoholgehalte steeds hooger is dan de theoretische hoeveelheid. Een gedeelte der waterstof zal dus, hoe dan ook, voor de reductie tot meer alcohol gebruikt zijn. Dit is de tweede reden waarom er minder waterstof gevonden wordt.

Uit het bovenstaande wordt het verder nog begrijpelijk, dat de moleculaire verhouding tusschen gevormd azijnzuur en omgezet melkzuur veelal wat af zal wijken van de theoretische waarde 0,5. We mogen aan dit verhoudingsgetal dus niet te groote beteekenis toekennen. Uit in tabel 13 en 14 te geven cijfers blijkt bovendien, dat deze verhouding gedurende het gistingproces belangrijk verschuift. Aan het einde der gisting stijgt zij soms tot ver boven 1. Echter, door de kleinere hoeveelheden, worden de bepalingfouten grooter, zoodat wij aan deze cijfers toch niet te veel waarde willen toekennen.

7. Gecombineerde suiker- en lactaatvergisting

Wij hebben reeds gezien, dat zich ook in de suiker-voedingsbodems een gisting, gepaard gaande met een sterke gasvorming, kan afspelen.

Aangezien wij weten, dat boekelscheurbacteriën uit suikers melkzuur vormen, kan het niet anders of de boekelscheurbacteriën zijn in staat het

door henzelf gevormde melkzuur weer af te breken op dezelfde wijze als zij ook lactaten vergisten. Wij bevestigden dit door de volgende proeven.

Op 25-2-41 entten wij een kolfje met verdunde gistautolysaat, $\frac{1}{2}$ % glucose en 1 % fosphaatbuffer, pH 6,48 met 1 % van de stam 12. De vloeistof werd van de lucht afgesloten met een laag steriele paraffineolie. Na 2 dagen bij 30° C trad gisting op.

Het omzettingsproces werd vervolgd met melkzuurbepalingen. Azijnzuurbepalingen gaven een indruk van het verloop der secundaire gisting. Tabel 12 geeft de resultaten.

TABEL 12

Vorming en ontleding van melkzuur in een glucose-voedingsbodem

	pH	mg per l	
		melkzuur	azijnzuur
Na 0 dagen	6,48	736	330
" 3 "	5,51	3813	504
" 7 "	5,56	2629	1071
" 14 "	6,13	589	1551
" 24 "	6,27	134	1785

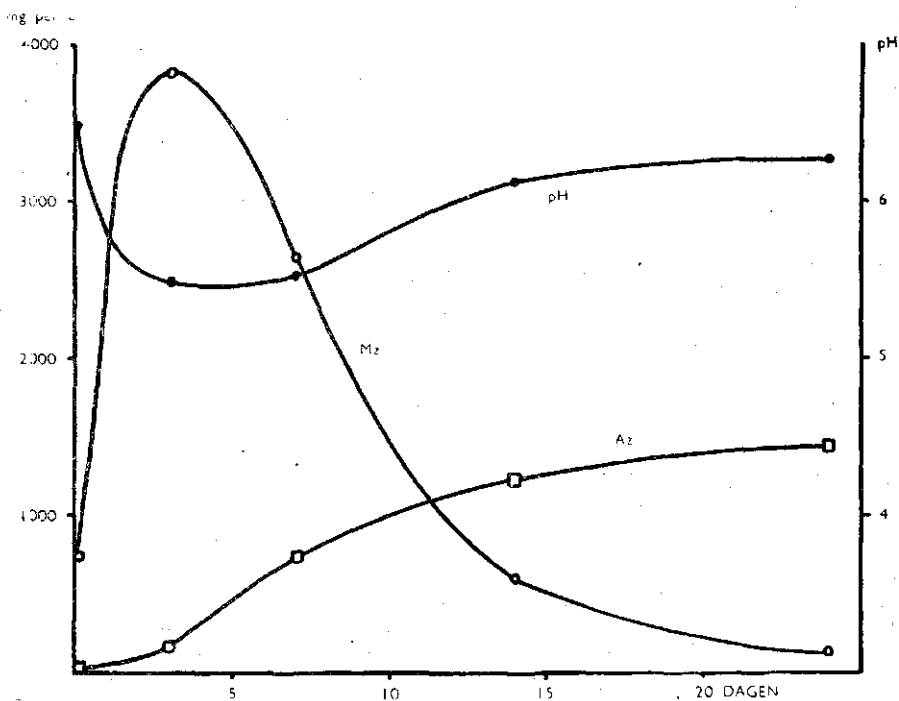


Fig. 2.

Vrijwel gelijktijdige vorming en ontleding van melkzuur (voor gegevens zie tabel 12)

In figuur 2 is dit grafisch voorgesteld, waarbij voor het azijnzuur de blancowaarde werd afgetrokken. Voor melkzuur is dit niet gedaan, omdat zelfs een gedeelte van het reeds in gistautolysaat voorhanden zijnde melkzuur later omgezet wordt.

Na een aanvankelijke stijging van het melkzuurgehalte, gepaard gaande met een daling van den pH, zien we spoedig het melkzuurgehalte verminderen, den pH stijgen en het azijnzuurgehalte niet onbelangrijk toenemen.

We zien hier bewezen, dat na een aanvankelijk overheerschen van de melkzuurvorming de melkzuurvergisting de overhand neemt. Beide dissimilatieprocessen worden hier door dezelfde bacterie in denzelfden voedingsbodem gelijktijdig uitgevoerd.

Men kan ook zeggen, dat melkzuur slechts een tusschenproduct is bij de vergisting van glucose tot azijnzuur, alcohol, CO_2 en H_2 ; een tusschenproduct echter dat zich gemakkelijk laat stabiliseeren. Immers voeren we dezelfde proef uit in niet gebufferde oplossingen, dan ontstaat slechts melkzuur.

Wij vroegen ons nu af of het ook mogelijk zou zijn de beide gistingsprocessen streng van elkaar te scheiden. Daartoe zou men aanvankelijk in niet gebufferd milieu moeten kweken en na afloop der suikeromzetting een steriel fosphaatmengsel moeten toevoegen.

Aanvankelijk werden de proeven als volgt uitgevoerd. In een steriele kolf van 500 ml werd na enting met 0,2 % der cultuur een nauwkeurig bekende hoeveelheid steriele voedingsbodem gebracht en wel zoodanig, dat de vloeistof tot in den hals der kolf stond, waarna ze afgedekt werd met een 1 à 2 cm dikke laag steriele paraffineolie. Na het optreden van den groei werden op gezette tijden monsters genomen tot alle suiker volledig was omgezet. Hierna werd het oorspronkelijk volume hersteld door toevoeging van een afgemeten hoeveelheid sterke fosphaatbufferoplossing in water (per 1 10 g KH_2PO_4 + 8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Nadat vervolgens de lactaatvergisting, gepaard gaande met zichtbare gasvorming ging optreden, werden weer monsters genomen. De nu bij de bepalingen verkregen waarden werden door vermenigvuldiging met den verdunningsfactor herleid tot de oorspronkelijke concentraties.

Tabel 13 geeft een overzicht van een proefreeks, waarbij de voedingsbodem bestond uit verdunde gistautolysaat met respectievelijk 0,4, 0,6 en 0,8 % glucose. De gebruikte stam was E_1 .

In figuur 3 zijn de uitkomsten van de proef met 0,4 % glucose grafisch voorgesteld. Ook hier werd voor het azijnzuur de blancowaarde afgetrokken.

In alle 3 gevallen trad de secundaire gisting niet spontaan op doch pas na verhooging van den pH van beneden 4 tot boven 4.

We zien nu inderdaad een gescheiden verloop der twee fermentatieve processen. Tot een volledige omzetting van suiker komt men natuurlijk eerder, wanneer de hoeveelheid suiker geringer is. Dit is wel van beteekenis bij de hier gekozen uitvoeringswijze, omdat bij langeren duur der proef ook meer monsters genomen worden. Het volume, dat door de monsternamen te loor ging, werd aangevuld met fosphaatbuffer in water en hierdoor

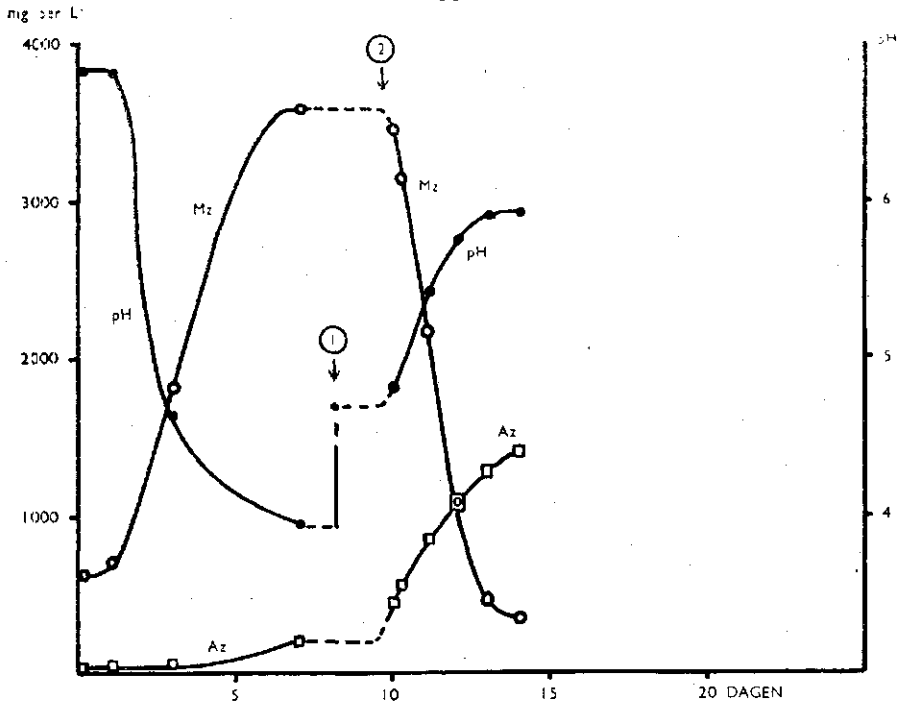


Fig. 3. Gescheiden vorming en ontleding van melkzuur.

Proef met 0,4 % glucose van tabel 13.

(1) Fosfaatbuffer toegevoegd. (2) Begin van de secundaire gisting.

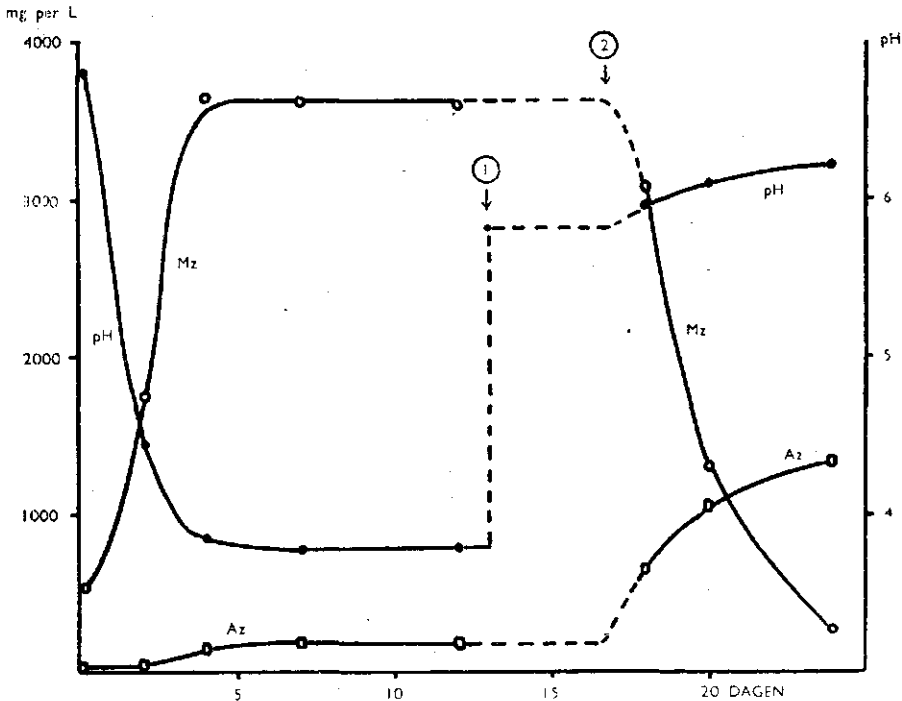


Fig. 4. Gescheiden vorming en ontleding van melkzuur.

Proef met stam N_2 van tabel 14.

(1) Fosfaatbuffer toegevoegd. (2) Begin van de secundaire gisting.

TABEL 13 *Gescheiden vorming en ontleding van melkzuur in een glucose-voedingsbodern*

Aantal dagen	0,4 % glucose				0,6 % glucose				0,8 % glucose					
	pH	mg per l		Suiker	Aantal dagen	pH	mg per l		Suiker	Aantal dagen	pH	mg per l		Suiker
		Mz	Az				Mz	Az				Mz	Az	
0	6,83	620	267	+	0	6,50	620	267	+	0	6,50	620	267	+
1	6,83	709	273	+	2	4,75	1018	288	+	2	4,75	930	288	+
3	4,61	1816	294	+	3	4,30	1727	318	+	4	4,27	1705	312	+
7	3,95	3565	468	—	9	3,82	3897	459	+	13	3,50	6161	555	—
8	4,70	Phosphaat toegevoegd			14	3,65	4457	546	—	21	3,56	5899	564	—
9—10		Phosphaat toegevoegd			18—19	4,90	Phosphaat toegevoegd			25—26	4,38	Phosphaat toegevoegd		
		Begin der gisting	mol. Az mol. Mz			Begin der gisting	mol. Az mol. Mz				Begin der gisting	mol. Az mol. Mz		
10	4,82	3455	706		19	5,17	4917	869		26	4,90	6360	830	
10½		3120	817	0,50	20	5,44	4067	1125	0,45	29	5,22	4980	1361	0,58
11	5,42	2148	1128	0,48	22	5,51	3278	1300	0,33	32	5,27	3132	1828	0,37
12	5,74	1051	1330	0,28	25	5,57	2792	1633	1,00	40	5,50	671	2727	0,55
13	5,90	421	1532	0,48	31	5,42	2731	1808	4,30	46	5,60	559	2911	1,66
14	5,90	337	1648	2,07										

De moleculaire verhouding azijnzuur : melkzuur werd berekend uit de sedert de vorige analyse ontlede, resp. gevormde hoeveelheden.

werd ook het N-gehalte van den bodem niet onbelangrijk verlaagd. Wij zagen dit als de reden, waarom in de proef met 0,6 % glucose de omzetting van het melkzuur een ontijdig einde nam. Daarom werd in volgende proeven de fosfaatbuffer steeds opgelost in een portie der zelfde, verdunde gistautolysaat als waarmede de proef genomen werd.

Vanzelfsprekend moest er bij de omrekening dan aan gedacht worden, dat dit gistautolysaat melkzuur en azijnzuur bevat.

In tabel 14 is een overzicht van een dergelijke proef gegeven met de stammen A₅, N₂ en C₁.

Van de proef met N₂, waarbij nog na de volledige suikerontleding langen tijd gewacht werd alvorens fosfaat toe te voegen, geeft fig. 4 een grafische voorstelling. Ook hier werd voor azijnzuur de blancowaarde afgetrokken, zoodat de Az-lijn de hoeveelheid gevormd azijnzuur voorstelt. Voor melkzuur is dit slechts gedaan voor dat gedeelte, dat te zamen met het fosfaat toegevoegd werd.

Ook in deze proeven zien wij dus weer een geheel gescheiden verloop van de twee fermentatieve processen. Terwijl bij een pH van $\pm 3,8$ de vergisting van het lactaat niet optreedt, is een verhooging van den pH tot 4,2 (zie bij C₁) reeds voldoende om de secundaire vergisting op gang te brengen. De kritische pH schijnt dus, althans bij het gebruik van glucose, bij omstreeks 4,0 te liggen.

Bij A₅ berekenden we bij de laatste bepaling een negatieve waarde voor Mz. Dit wil slechts zeggen, dat ook een gedeelte van het met de fosfaatbuffer toegevoegde lactaat (= 524 mg per l) vergist werd.

Bij stam N₂ werd na de volledige suikeromzetting nog 6 dagen gewacht, voor dat fosfaat toegevoegd werd. Desondanks trad 4½ dag later toch nog gisting op.

Slechts bij stam C₁ zien we aan het einde der proef een sterke toename in de verhouding der moleculaire hoeveelheden azijnzuur en melkzuur.

8. Systematiek en naamgeving

We willen thans de vraag nog onder oogen zien tot welke soort bacteriën de boekelscheurbacteriën behooren en of zij identiek zijn met een reeds in de literatuur beschreven soort.

Volgens het onderzoek is de boekelscheurbacterie een melkzuurbacterie, zij het dan met zeer bijzondere eigenschappen.

De vorming van melkzuur uit koolhydraten, het Gram-positief, facultatief anaerob en katalase-negatief zijn der onbeweeglijke staafvormige bacteriën en de vorm der koloniën vestigt ondubbelzinnig den indruk, dat we hier met een melkzuurbacterie te maken hebben. Dit is tenminste het geval wanneer we in niet gebufferde media kweken en er dus geen azijnzuur, koolzuur en waterstof wordt geproduceerd. Het laat zich heel goed indenken, dat deze bacteriën als melkzuurbacteriën zouden zijn geïsoleerd. Men zou ze dan tot de groep der homofermentatieve melkzuurbacteriën hebben gerekend, omdat ze geen bijproducten vormen. Op grond van hun vermogen tot aantasting van verschillende koolhydraten laten ze zich dan echter niet identificeren met reeds bekende typen.

TABEL 14

Melkzuurvorming, gevolgd door lactaatvergisting in verdunde gistautolysaat + 0,5 % glucose

Aantal dagen	A ₅				N ₂				C ₁					
	pH	mg per l		Suiker	Aantal dagen	pH	mg per l		Suiker	Aantal dagen	pH	mg per l		Suiker
		Mz	Az				Mz	Az				Mz	Az	
0	6,80	524	321	+	0	6,80	524	321	+	0	6,80	524	321	+
2	4,31	2207	330	+	2	4,44	1748	315	+	5	4,15	2330	375	+
4	3,85	3698	339	+	4	3,86	3655	462	+	8	3,77	4040	480	—
7	3,68	4560	393	—	7	3,77	3591	510	—					
7	4,47	Phosphaat toegevoegd			13	5,83	Phosphaat toegevoegd			8	4,19	Phosphaat toegevoegd		
8—9	Begin der gisting	mol. Az mol. Mz			17—18	Begin der gisting	mol. Az mol. Mz			12	Begin der gisting	mol. Az mol. Mz		
9	4,78	4008	663		18	5,96	3076	967		12	4,20	4099	587	
11	5,53	674	1611	0,43	20	6,10	1296	1410	0,37	14	4,87	1565	1321	0,43
14	5,71	—224	1845	0,39	24	6,22	264	1661	0,37	18	5,50	251	1600	0,32
										21	5,66	124	1712	1,32

We hebben de boekelscheurbacteriën echter allereerst leeren kennen als lactaatvergistende bacteriën en dit lactaatvergistingsvermogen is zóó typeerend, dat wij dit bij de identificatie niet verwaarloozen mogen. De meest opvallende eigenschap van deze bacterie is, dat zij in staat is twee fermentatieve processen, de melkzuurvorming en de melkzuurafbraak, zoowel gelijktijdig als achtereenvolgens in denzelfden voedingsbodem uit te voeren.

Deze eigenschap vinden we in de literatuur eveneens vermeld voor *Lactobacillus pentoaceticus* (*Betabacterium breve* Orla Jensen). PETERSON en FRED (9) namen ook bij deze bacterie een zij het langzame en onvolledige omzetting van het gevormde melkzuur in azijnzuur waar. Op grond van de verwantschap met deze bacteriën zou men dus de boekelscheurbacteriën tot de heterofermentatieve betabacteriën kunnen rekenen en men zou dus de vorming van azijnzuur, koolzuur en waterstof als een bijproductenvorming moeten beschouwen. Ja men zou zich zelfs de theoretisch interessante vraag kunnen stellen of niet bij alle betabacteriën de bijproductenvorming te wijten is aan een secundaire afbraak van het gevormde melkzuur. Dan zouden dus alle betabacteriën in staat moeten zijn lactaten te vergisten. Bij enkele proeven, die we hierover namen, kon het lactaatvergistend vermogen van betabacteriën evenwel niet met zekerheid vastgesteld worden.

Bezien we de verwantschap tusschen de boekelscheurbacterie en *Betabacterium breve* nauwkeuriger, dan zien we tusschen beide bacteriën zulke groote verschillen, dat ze niet alleen beslist niet identiek zijn, maar dat ook de verwantschap slechts zeer gering is. *Betabacterium breve* tast arabinose en xylose aan, de boekelscheurbacterie doet dit niet. Deze vergist daarentegen manniet en sorbiet, welke *Betabacterium breve* niet gebruiken kan; *Betabacterium breve* vormt zelfs manniet, n.l. uit fructose, de boekelscheurbacterie mist deze eigenschap totaal, hetgeen wij in een speciaal daartoe opgezette proef nog eens nagingen. Bij vergisting van suikers vormt *Betabacterium breve* behalve melkzuur nog azijnzuur, aethylalcohol en CO_2 maar geen waterstof. Weliswaar is in de literatuur o.a. bij ORLA JENSEN een enkele aanwijzing te vinden, dat bij betabacteriën wel eens vorming van waterstof is geconstateerd, maar dit is dan toch in elk geval slechts in sporen geweest. De boekelscheurbacterie vormt echter bijna evenveel waterstof als koolzuur. En ten slotte kan door de boekelscheurbacteriën het gevormde melkzuur totaal afgebroken worden, hetgeen bij de betabacteriën nooit het geval is. Op grond van al deze verschillen lijkt het ons niet verantwoord de boekelscheurbacteriën tot de betabacteriën te rekenen.

Wij meenen voor dit op zichzelf staande geval niet over te moeten gaan tot het opstellen van een nieuw geslacht. Wij willen ook in de kwestie der hetero- of homofermentativiteit van deze melkzuurbacterie geen stelling kiezen. De nomenclatuur volgens BERGEY geeft ons in den geslachtsnaam *Lactobacillus* hiertoe de mogelijkheid. In verband met de zeer karakteristieke eigenschap der boekelscheurbacterie om tweeërlei gistingen als energie leverende processen te kunnen gebruiken stellen we den naam ***Lactobacillus bifermentans*** voor.

Samenvatting

De eigenschappen der boekelscheurbacteriën, die in kaas een abnormale gasvorming kunnen veroorzaken, werden nader onderzocht. De isolatie van deze bacteriën geschiedt het beste met behulp van een pepton-calcium-lactaat-voedingsbodem van pH = 5,5. Verlaging van den pH tot 4,5 maakt den bodem selectiever, doch verhoogt de kans op niet aanslaan van zuur-gevoelige stammen. Ook gistautolysaat-natriumlactaat-agar kan voor de isolatie gebruikt worden.

Het is een staafvormige bacterie, 1,5 à 2,0 μ lang en 0,5 à 1,0 μ breed, dikwijls aan het eene einde wat toegespitst (zie foto 1 en 2).

De bacterie is onbeweeglijk, facultatief anaerob, Gram-positief en katalase-negatief. Gelatine wordt niet vervloeid. De koloniën op weigelatine en vleeschbouillon-gelatine zijn klein rond, in gistautolysaat-natriumlactaat-agar zaadvormig en vuilgroen van kleur. De optimumtemperatuur bedraagt $\pm 30^\circ$ C. De bacterie wordt gedood door een verhitte van 10 minuten op $50\text{--}55^\circ$ C.

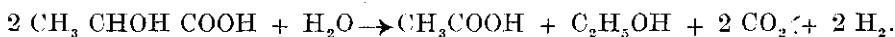
Uit suikers en enkele polyalcoholen wordt inactief melkzuur gevormd. Tabel 2 geeft een overzicht van de verbindingen, die aangetast kunnen worden.

Daarnaast kunnen ook melkzure zouten worden vergist, aan welke eigenschap de bacterie haar gevaarlijkheid voor kaas ontleent. In den gebruikten voedingsbodem vond deze omzetting van lactaten vrijwel even goed plaats bij pH 4,65, 5,55 en 6,65 (zie tabel 3). De pH van den voedingsbodem wordt gedurende deze gisting hooger. De omzetting geschiedde vollediger wanneer door sterker bufferen der voedingsvloeistof de stijging van den pH beperkt bleef (tabel 4).

Als gistingsproducten bij de omzetting van melkzuur werden bij de eerste proeven azijnzuur, kooldioxyde en waterstof gevonden. De beide laatste producten ontstaan, zooals uit de tabel 5, 6 en 7 blijkt, gedurende de omzetting in wisselende verhouding. Aanvankelijk werd meer CO_2 dan H_2 gevonden, later ontstond meer H_2 dan CO_2 (zie Fig. 1).

Uit de gistingsbalansen, in deze tabellen weergegeven, bleek tevens, dat er nog een ander koolstofbevattend eindproduct moest worden gevormd. Dit is, zooals na eenig zoeken bleek, aethylalcohol.

Nieuwe gistingsbalansen (tabel 8 en 9) leverden bevredigende uitkomsten, waaruit volgde, dat de boekelscheurbacteriën uit melkzuur of lactaten azijnzuur, aethylalcohol, kooldioxyde en waterstof vormen. Een berekening van de verhouding, waarin deze gistingsproducten ten opzichte van het omgezette melkzuur gevormd worden (tabel 10 en 11), leerde dat de omzetting het beste voorgesteld kon worden door de vergelijking:



Bij de omzetting van suikers en polyalcoholen kan het gevormde melkzuur eveneens vergist worden tot azijnzuur, aethylalcohol CO_2 en H_2 . Bij proeven hierover in een glucose-voedingsbodem genomen, bleek het al of niet optreden van deze secundaire gisting afhankelijk te zijn van den pH. Indien de pH van den voedingsbodem door het gevormde melkzuur

snel beneden 4,0 daalde, trad zij niet op. Bleef hij boven 4,0 of werd hij door toevoeging van fosphaatbuffer boven 4,0 gebracht, dan had de secundaire gisting wel plaats. Zoo was het mogelijk in de glucose-voedingsvloeistof zoowel een vrijwel gelijktijdige (tabel 12, Fig. 2) als ook een gescheiden (tabellen 13 en 14, Figuren 3 en 4) melkzuurvorming en melkzuurafbraak te laten verlopen.

In verband met de vorming van melkzuur uit suikers en met de andere cultureele eigenschappen moet de boekelscheurbacterie tot de groep der melkzuurbacteriën gerekend worden. Om uitdrukking te geven aan de karakteristieke eigenschap om in denzelfden voedingsbodem twee fermentatieve processen te kunnen uitvoeren, werd den naam **Lactobacillus bifermentans** voorgesteld.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein schon früher (2) beschriebenes, laktatvergärendes Bakterium, welches in Niederländischen Käse eine Spätgärung verursachen kann und gegenwärtig unter den Namen „Boekelscheurbacterie“ bekannt ist, wurde genauer untersucht.

Die Isolierung dieser Bakterien aus Käse gelingt schwierig, weil sie meistens nur in geringer Anzahl anwesend sind und andere laktatvergärenden Bakterienarten störend wirken. Am besten gefiel uns eine Anhäufung in Peptoncalciumlaktatnährboden von pH 5,5 oder 4,5 unter anaeroben Verhältnissen. Die Selektivität dieses Nährbodens ist grösser bei pH 4,5 aber auch die Möglichkeit dass die Bakterien bei diesem höheren Säuregrade nicht angehen ist grösser, weshalb wir meistens Kulturen von beiden pH-Werten anlegten. Durch Abimpfen auf Molkengelatine oder Peptoncalciumlaktatgelatine wurde reinkultiviert. Auch Hefeautolysatnatriumlaktatagar mit Pyrogallolverschluss kann zur Isolierung der Bakterien verwendet werden. Die in diesem Boden gebildeten Kolonien haben dieselbe Struktur wie Propionsäurebakterienkolonien; sie sind aber viel kleiner, von fester Beschaffenheit und von einer graugrünen Farbe.

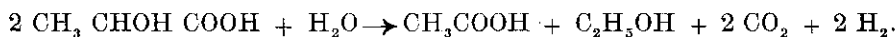
Die wichtigsten kulturellen Merkmale der Bakterie sind folgende: Stäbchen, oft etwas zugespitzt (siehe Foto 1 und 2), zu zweien oder in kleinen Ketten, 1,5—2,0 μ lang, 0,5—1,0 μ breit. Nicht beweglich, nach Gram färbbar, ohne Katalase, fakultativ anaerob. Gelatine wird nicht verflüssigt. Optimum-Temperatur \pm 30° C. Die Abtötung der Bakterien erfolgt bei einer Erhitzung von 10 Minuten auf 50—55° C. Eine gelinde Pasteurisierung der Käsemilch genügt also zum Vorbeugen dieser Laktatvergärung im Käse.

Die Bakterien sind zu folgenden physiologischen Leistungen im stande. Eine Reihe von Kohlehydraten können in inaktive Milchsäure umgesetzt werden. Von allen Stämmen wurde, wie Tabelle 2 angibt, vergoren: Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Maltose, Rhamnose, Sorbit und Mannit, von einem der Stämme obendrein Laktose, Saccharose und Raffinose. Keine der Stämme griff Arabinose, Xylose, Glyzerin, Stärke, Dextrin, Salizin, Inulin oder Dulzit an.

Daneben sind diese Bakterien im stande milchsaure Salze als Kohlenstoffquelle zu benutzen. Diese Laktatvergärung verläuft bei pH 4,65, 5,55 und 6,65 fast gleich gut (Tabelle 3). Bei der Vergärung der Laktaten steigt der pH ziemlich schnell an. Durch eine stärkere Pufferung des Nährbodens bleibt der pH niedriger, wodurch eine vollständigere Umsetzung zu erreichen ist. Innerhalb 30 Tagen wurde auf diese Weise beim Stamm A₃ 98,6 % und beim Stamm E₁ 98,2 % vergoren (Tabelle 4).

Zu den Gärungsprodukten der Laktatvergärung gehört ausser den schon früher gefundenen Essigsäure, Kohlensäure und Wasserstoff auch, wie einwandfrei nachgewiesen wurde, Äthylalkohol. Es wurden einige Gärungsbilanzen aufgestellt, teilweise ohne Bestimmung des Äthylalkohols (Tabelle 5, 6 und 7), teilweise mit Bestimmung aller Gärungsprodukten (Tabelle 8 und 9). Es ergab sich hieraus, dass das Verhältnis der Gärungsprodukten nicht konstant ist. Während der Gärung variierte z.B. das Verhältnis CO₂ : H₂ auf beträchtliche Weise (Fig. 1).

Obwohl zu wenig Wasserstoff gefunden wurde, was mit einer Reduktion von etwas Milchsäure zu Propionsäure und mit einer verhältnismäßig stärkeren Bildung von Athylalkohol auf Kosten der Essigsäure erklärt werden kann, wird die Gärung am besten vorgestellt durch die Gleichung:



Bei der Zuckervergärung kann die gebildete Milchsäure gleichfalls weiter vergoren werden. In Glukosenährlösungen war das Auftreten dieser so zu sagen sekundären Gärung vom pH abhängig. Sank der pH schnell unterhalb 4,0, so blieb die sekundäre Gärung aus. Wenn der pH durch die Zuckervergärung nicht unterhalb 4,0 kam, oder wenn der pH nachher durch Zufügung einer Phosphatpufferlösung oberhalb 4,0 gebracht wurde, so trat eine Vergärung der gebildeten Milchsäure ein. Es was somit möglich mit Hilfe dieser Bakterien in derselben Nährlösung eine Bildung und ein Abbau der Milchsäure zu stande zu bringen. Die beiden Prozesse können fast gleichzeitig wie Tabel 12 und Fig. 2 angibt, verlaufen oder mit einer Zwischenzeit von mehreren Tagen (Tabellen 13 und 14, Figuren 3 und 4).

Ihren Eigenschaften nach ist die „Boekelscheurbacterie“ eine Milchsäurebakterie. Sie lässt sich aber mit keiner der bekannten Arten identifizieren. Wenn keine sekundäre Gärung auftritt, werden fast keine Nebenprodukte gebildet und ist sie den homofermentativen Milchsäurebakterien sehr ähnlich. Wenn aber eine sekundäre Gärung auftritt, kann man sie als eine heterofermentative Milchsäurebakterie betrachten, obwohl eine starke Wasserstoffbildung bis jetzt noch nie bei einer Milchsäurebakterie gefunden ist und es weiter zu beachten ist, dass die Milchsäure restlos vergoren wird. Eine schwache sekundäre Laktatvergärung wurde von PETERSON und FRED (9) auch beobachtet bei *Lactobacillus pentoaceticus*. Die „Boekelscheurbacterie“ ist mit dieser Bakterie aber bestimmt nicht identisch.

Wegen des Vermögens zur Ausführung von zwei Dissimilationsprozessen im selben Medium schlagen wir den Name **Lactobacillus bifermentans** vor.

SUMMARY

A lactate fermenting bacterium, causing subsequent blowing in Netherland cheeses (2) and known in our country under the name „boekelscheurbacterie” was studied more in detail.

The isolation of these bacteria from cheese is best achieved by inoculation of decimal dilutions in peptone-calciumlactate broth (pH 5,5 or 4,5), cultivation under anaerobic conditions at 30° C and subsequent plating of the fermented tubes on whey gelatin or peptone-calciumlactate-gelatin. At the pH of 4,5 the broth is more selective but this pH is about the lowest where growth of the boekelscheurbacteria is possible and therefore not advisable to use only. At higher pH other lactate fermenting bacteria, such as butyric acid- and propionic acid bacteria may hinder. We therefore generally make cultures in broth of both pH.

Just as propionic acid bacteria the boekelscheurbacteria grow well in yeastautolysate-sodiumlactate-agar and can sometimes directly be isolated from this medium. The colonies are of the same shape but much smaller than those of the propionic acid bacteria and of a pale green color.

The most important cultural characteristics are summarised as follows: Rods, 0,5 to 1,5 by 1,5 to 2,0 microns, occurring singly, in pairs or short chains. The cells are frequently pearshaped (see foto 1 and 2). Non-motile. Gram-positive. Katalase negative. Facultative anaerobe. No liquefaction of gelatin. Optimum temperature \pm 30° C. Thermal death point 10 minutes at 50—55° C; so a mild pasteurization of the cheese milk can prevent the subsequent blowing by these bacteria.

Nineteen carbohydrates were used in studying the fermentation reactions of six strains (see table 2). All the strains fermented dextrose, laevulose, galactose, mannose, maltose, rhamnose, sorbitol and mannitol, one of the strains also fermented lactose, sucrose and raffinose. No fermentation was obtained with arabinose, xylose, glycerol, starch, dextrin, salicin, inulin and dulcitol.

The carbohydrate was converted in inactive lactic acid.

On the other hand lactic acid and lactates can also serve as carbon sources and this is the reason why these bacteria are dangerous for cheese.

The fermentation of lactate, which proceeds practically in the same way when the pH at the beginning is 4,65, 5,55 or 6,65 (see table 3) is more complete in a medium well buffered by phosphate mixtures (table 4). Within 30 days at 30° C 98,6 % and 98,2 % of the lactic acid could be fermented by strain A₅ and E₁ respectively.

Lactic acid or lactates are fermented to acetic acid, ethylalcohol, carbondioxyde and hydrogen. Because ethylalcohol was detected as one of the fermentation products in the course of this investigation, fermentation balances were made partly without (tables 5, 6 and 7) and partly with the quantitative determination of this product (tables 8 and 9). In the latter fairly good results in the carbon balances were obtained.

The quantities of fermentation products stood not in a constant relation. For example the relation between carbondioxide and hydrogen varies considerably during the fermentation (see fig. 1). But also the total

amount of each product was different in each experiment. Nevertheless we believe that the results may almost be expressed by the following equation:



The deficit of hydrogen may be explained by the reduction of some lactic acid to propionic acid and by the somewhat greater production of ethyl-alcohol than of acetic acid.

The most striking feature of the *boekelscheurbacteria* is that they can readily ferment in the same medium the lactic acid, formed by the fermentation of carbohydrates. This secondary fermentation was studied more in detail in dextrose-yeastautolysate medium. It took only place in well-buffered solutions, where the pH did not sink rapidly below 4,0 or when the pH afterwards was brought above 4,0 by means of a phosphate mixture. In the first case the formation and decomposition of lactic acid occurred almost simultaneously, although the formation is more rapid in the beginning (table 12, fig. 2), in the latter the secondary fermentation can be brought about many days after the fermentation of dextrose to lactic acid is completed (tables 13 and 14, fig. 3 and 4).

With regard to the cultural characteristics and the fermentation of carbohydrates to lactic acid the bacterium is a homofermentative lactic acid bacterium. In this phase byproducts are not formed. If a secondary fermentation takes place it resembles a heterofermentative lactic acid bacterium, though a production of hydrogen by lactic acid bacteria is not mentioned with certainty in literature and attention must be drawn to the fact that the lactic acid is completely fermented. A very slow secondary fermentation of lactates was observed by PETERSON and FRED (9) with *Lactobacillus pentoaceticus*. The „*boekelscheurbacterie*” is certainly not identical with this bacterium.

We propose therefore a new name, ***Lactobacillus bifermentans***, which indicates that the bacterium can accomplish two dissimilation processes in the same medium.

Literatuur.

- (1) F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, Over boekelscheuren in kaas. Versl. v. landbk. Onderz. **11** (1912) 5. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1909, 84. Revue générale du Lait VIII (1910) 3. Zentralbl. f. Bakt. II **28** (1910) 98.
- (2) F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, De normale gasvorming in kaas. Versl. v. landbk. Onderz. **21** (1917) 14. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1915, 73. Zentralbl. f. Bakt. II **48** (1918) 130.
- (3) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Het aantoonen van gasvormende bacteriën in kaas. Versl. v. landbk. Onderz. **48** (1942) 765. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1942, 35.
- (4) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE, Propionzuurbacteriën in Goudsche en Edammer kaas. Versl. v. landbk. Onderz. **47** (1941) 1101. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1941, 23.
- (5) T. E. FRIEDEMANN, M. COTONIO en PH. A. SHAFFER, Journ. Biol. Chem. **73** (1927) 335, en
T. E. FRIEDEMANN en J. B. GRAESER, Journ. Biol. Chem. **100** (1933) 291.
- (6) J. VAN BEYNUM, De bepaling van vluchtige vetzuren volgens de destillatiemethode. Versl. v. landbk. Onderz. **39** (1933) 57. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1932, 33.
- (7) K. BERNHAUER, Gärungschemisches Praktikum. Berlijn 1939, pg. 188.
- (8) T. E. FRIEDEMANN en R. KLAAS, Journ. Biol. Chem. **115** (1936) 47.
- (9) W. H. PETERSON en E. B. FRED. Journ. Biol. Chem. **42** (1920) 273.