

α -Keto Acids in Cultures of Lactic and Propionic Acid Bacteria and in some Cheese Varieties

MATTI KREULA and ARTTURI I. VIRTANEN

Laboratory of Valio, Biochemical Institute,
Helsinki, Finland

Using the same method (hydrogenolysis of 2,4-dinitrophenylhydrazones with tin in hydrochloric acid solution to the corresponding amino acids and establishing these by paper chromatography) as Alfthan and Virtanen used for the estimation of many new keto acids in plants, the present authors established the α -keto acids shown in Table 1 in cultures of lactic and propio-

nic acid bacteria as well as in some cheese varieties. When determining keto acids in the nutrient and culture solutions, proteins were first removed by adding 10 % solution of sodium tungstate and 2/3 N sulphuric acid in the proportion test solution: tungstate solution:sulphuric acid 2:1:2 (v/v). 200 ml of test solution was generally used. The filtrate was further treated according to Alfthan and Virtanen¹ (cf. also Kreula and Virtanen²). When investigating cheese, "tear fluid", and yeast, 100 ml of 10 % sodium tungstate and 14 ml of 5 N sulphuric acid were added to 50 g of the substance to be investigated. The mixture was diluted with water to 500 ml, homogenized, and filtered. The filtrate was treated as mentioned in connection with bacterial cultures.

Table 1. The corresponding amino acids of α -keto acids found in bacterial cultures, yeast, and some cheese varieties.

Material	Corresponding amino acids of α -keto acids *
<i>Lactic acid bacteria</i>	
Milk	1, 2, 8, 17
Milk + <i>Streptococcus thermophilus</i> (45°C, 1 day)	1, 2, 8, 17
Milk + <i>Lactobacillus helveticus</i> (42°C, 1 day)	1, 2, (3), (5), 8, (9), 16, 17
<i>Propionic acid bacteria</i>	
Nutrient solution (whey fermented with <i>L. helveticus</i> , addition of chalk, + yeast extract + peptone; pH 6.5)	1, 2, 16, 17
Nutrient solution + <i>Propionibacterium</i> V (30°C, 3 days)	2, 3, 7, 16, 17
Nutrient solution + <i>Propionibacterium</i> V (30°C, 3 days)	1, 2, 7, 16, 17
Nutrient solution + <i>Propionibacterium</i> V (30°C, 16 days)	1, 2, 8, 16, 17
Nutrient solution + <i>Propionibacterium</i> 101 (30°C, 16 days)	1, 2, 8, 16, 17
Nutrient solution + <i>Propionibacterium</i> V (30°C, 29 days)	2, 17
<i>Baker's yeast</i>	
	1, 2, 8, 17
<i>Cheeses</i>	
Emmental cheese, 3 months old	1, 2, 8, 16, 17
Emmental cheese, 6 months old	1, 2, 8, 16, 17
Emmental cheese, over 12 months old	1, 2, 3, 5, 8, 16, 17
"Tear fluid" of Emmental cheese	2, 3, 17
Mouldy cheese (Roquefort)	1, 2, 3, 4, 5, 16, 17

* The keto acids are: 1 = glyoxylic acid, 2 = pyruvic acid, 3 = α -ketoisovaleric acid, 4 = α -ketoisocaproic acid, 5 = α -ketocaproic acid, 7 = *para*-OH-phenylpyruvic acid, 8 = OH-pyruvic acid, 9 = β -OH-butyric acid, 16 = oxalacetic acid, 17 = α -ketoglutaric acid; italics = + + +, parenthesis = +.

As can be seen from Table 1 new keto acids, in addition to 1, 2, 8, and 17, originally found in milk, were not found in the milk culture of *Str. thermophilus*, whereas in the culture of *L. helveticus* small amounts of 3, 5, and 9, and a larger amount of 16 were found. In the culture solution of propionic acid bacteria keto acid 7 was found after 3 days in addition to 1, 2, 16, and 17 which were present in the nutrient solution from the beginning, after 16 days keto acid 8, whereas after 19 days only keto acids 2 and 17 remained.

3- to 6-month-old Emmental cheese contains keto acids 1, 2, 8, 16, and 17; 12-month-old Emmental cheese keto acids 3 and 5 in addition. In the fluid secreted in the eyes of older cheese only keto acids 2, 3, and 17 were found.

In mouldy cheese (Roquefort) keto acids 1, 2, 3, 4, 5, 16, and 17 were found.

1. Alfthan, M. and Virtanen, A. I. *Acta Chem. Scand.* **9** (1955) 86.
2. Kreula, M. and Virtanen, A. I. *Proceedings of the XIVth International Dairy Congress, Roma 1* (1956) 802.

Received July 25, 1957.

Über einen antifungalen Faktor aus den grünen Teilen der Heidelbeerpflanze (*Vaccinium myrtilus*)

K. RAIBLE* und ARTTURI I. VIRTANEN

*Laboratorium der Stiftung für chemische
Forschung, Biochemisches Institut,
Helsinki, Finnland*

In früheren Arbeiten aus diesem Laboratorium konnte gezeigt werden, dass alle bisher untersuchten Kulturpflanzen Stoffe enthalten, die das Wachstum des pflanzenpathogenen Pilzes *Fusarium nivale* und vieler anderer Pilze zu hemmen vermögen, und dass mit der Anwesenheit solcher Stoffe die Resistenz bzw. die Anfälligkeit der betreffenden Pflanze gegenüber dem

genannten Mikroorganismus erklärt werden kann¹. Aktive Substanzen sind bisher in reinem Zustand aus jungen Roggen², Weizen- und Maispflanzen³ sowie auch aus Rotklee⁴ isoliert und chemisch charakterisiert worden. Wir haben in letzter Zeit auch einige wilde Pflanzen auf das Vorkommen antifungaler Substanzen untersucht. In den grünen Teilen der Heidelbeerpflanze (*Vaccinium myrtilus*) haben wir eine ungewöhnlich hohe Aktivität gegen *Fusarium nivale* gefunden. Die Aktivität ist im frischen Laub während der Frühjahrsmonate ebenso nachzuweisen wie in altem Laub und auch in den Stengeln während des Winters, wobei auch stets die Menge an dem aktiven Stoff etwa die gleiche ist. Die antifungale Wirksamkeit 70 % alkoholischer Extrakte (Presssäfte können wegen des geringen Wassergehaltes der Pflanzen meist nur in unzureichendem Mass gewonnen werden) beträgt etwa 15 Einheiten, d.h. aus 1 g Pflanzenmaterial gewonnener Extrakt reicht aus um das Wachstum von *Fusarium nivale* auf 15 ml Hafermehlagermedium völlig zu hemmen. Zusammensetzung des Mediums: 50 g Hafermehl, 5 ml Glycerin, 1,5 ml Milchsäure, 7 g KHPO₄, 35 ml 0,2 M Na₂HPO₄-Lösung, 1 000 ml Wasser. pH des Mediums 4,7–4,8.

Untersuchungen über die Art des antifungalen Faktors ergaben, dass es sich hierbei offenbar um eine gerbstoffartige Substanz oder um ein Gemisch von solchen Stoffen handelt. Der antifungale Faktor ist gut löslich in Wasser, Äthanol, Methanol und Aceton, unlöslich hingegen in wasserfreiem Äther, Petroläther und Benzol. Die Substanz reagiert neutral und passiert daher sowohl den sauren Amberlite-Jonenaustauscher IR 120 als auch die stark basischen Harze IRA 410 und IRA 400.

Aktive Extrakte mit 10–15 Einheiten pro 1 g Pflanzenmaterial konnten erhalten werden beim Variieren der Extraktionsmethoden und -temperaturen wie folgt:

1) 100 g Pflanzenmaterial + 500 ml 60 % Äthanol, 3 Std digeriert, abgepresst, Presskuchen nochmals ebenso behandelt.

2) Wie 1, jedoch 12–14 Std digeriert bei Zimmertemperatur oder bei –5°C.

3) 100 g Pflanzenmaterial + 1 l Methanol 12 und 48 Std digeriert, dann weiter wie bei 1.

4) Wie 3, jedoch Zusatz von 5 und auch 10 g K-metabisulfit (Extrakt vor dem Test selbstverständlich durch sauren und basischen Jonenaustauscher geleitet).

* Die jetzige Adresse: Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, München 23, Leopoldstrasse 175, Deutschland.