

Versuche über Milchproduktion ohne Protein unter ausschließlicher Verwendung von Harnstoff und Ammoniumstickstoff

Seitdem die entscheidende Bedeutung der essentiellen Nährfaktoren *) für die Gesundheit des Menschen klargeworden ist und man erkannt hat, daß die Verminderung der Menge an Energienahrung bis zu einer gewissen Grenze unschädlich ist, hat der Ausdruck „Hungersnot“ einen bedeutend anderen Inhalt als früher erhalten. Man hat jetzt die Aufmerksamkeit in erster Linie auf die Frage konzentriert, wie die essentiellen Nährfaktoren unterernährten Menschen in ausreichendem Maße zugänglich gemacht werden können. Viele Pläne zur Erzeugung der essentiellen Aminosäuren auf anderen Wegen als mit Hilfe der Landwirtschaft sind entworfen worden. Vielversprechend sind die Versuche, Mikroorganismen zu kultivieren, die entweder Kohlendioxyd assimilieren oder organische Kohlenstoffverbindungen benutzen und in ihren Zellen aus einfachen, von der Großindustrie billig erzeugten Stickstoffverbindungen biologisch wertvolle Proteine bilden. Gleichzeitig synthetisieren die Mikroorganismen die meisten Vitamine der B-Gruppe. Alle diese Methoden befinden sich jedoch im Versuchsstadium. Weil es sich um menschliche Nahrung handelt, müssen Geschmack und Zuträglichkeit der neuen Produkte eingehend erprobt werden, bevor man mit ihrer eigentlichen Herstellung beginnen kann. Es geht somit nicht nur um den biologischen Wert der Mikrobenproteine, sondern auch um andere, eventuell schädliche Substanzen der Mikrobenzellen.

Der Pansen der Wiederkäuer ist ein natürlicher Gärungsbehälter, in dem die verschiedenen Bestandteile des Futters in großem Umfang gespalten werden, wobei die Mikroben gleichzeitig ihre Zellsubstanz aufbauen. Die Vorgänge im Pansen sind jedoch viel komplizierter als die in industriellen Gärungsprozessen, bei denen als Substrat eine bestimmte Kohlenstoffverbindung (Zucker, Äthanol etc.) und als Agens die Reinkultur einer Mikrobe (Hefe, Bakterie oder Schimmel) dienen. Im Pansen werden die im Futter befindlichen verschiedensten Substanzen (Cellulose, Zucker, Proteine, Fette) gleichzeitig gespalten oder auf andere Weise verändert, so daß die Mikrobenflora des Pansens viele verschiedene Arten umfassen muß. Eine große Anzahl von Bakterien verschiedener Gattungen und Arten ist aus dem Inhalt des Pansens auch isoliert worden. Außer Bakterien enthält der Pansen auch reichlich Protozoen, die Bakterien als Nahrung verwenden, aber auch Cellulose, Zucker etc. sowie Gärungsprodukte der Bakterien. Die

*) Vortrag, gehalten am 28. Mai 1964 im Rahmen des Ernährungswissenschaftlichen Colloquiums des Instituts für Ernährungswissenschaft der Justus Liebig-Universität. Das Manuskript ist inzwischen durch einige neuere Beobachtungen ergänzt worden.

Funktion und Bedeutung der Protozoen im Pansen vom Standpunkt der Ernährung der Wiederkäuer aus ist noch unklar. Die entscheidende Bedeutung der Bakterien ist dagegen sichergestellt und experimentell bewiesen. Viele Einzelheiten bezüglich der Pansenbakterien und deren metabolischen Reaktionen sind jedoch noch im Dunkeln.

Die symbiotischen Verhältnisse zwischen den verschiedenen Bakterien im Pansen sind offensichtlich sehr wichtig. V. NURMIKKO hat derartige Verhältnisse zwischen verschiedenen Milchsäurebakterien in seiner Doktorarbeit behandelt, die er vor zehn Jahren in diesem Laboratorium ausführte¹⁾. Diese Bakterien haben sehr große Ansprüche hinsichtlich verschiedener Nährfaktoren, besonders was Aminosäuren und Vitamine betrifft, obwohl die Ansprüche verschiedener Arten der Milchsäurebakterien einigermaßen unterschiedlich sind. Wenn irgendein Milchsäurebakterium in Reinkultur gezüchtet wird, muß die Nährlösung alle Nährfaktoren enthalten, die für das Bakterium unerläßlich sind. NURMIKKO konnte nun beweisen, daß Bakterienzellen erhebliche Mengen von Aminosäuren und Vitaminen in die Nährlösung absondern und daß verschiedene Bakterienarten dadurch einander ernähren können. Daraus folgt, daß die Milchsäurebakterien in Mischkulturen eine viel einfachere Nährlösung für das Wachstum brauchen als in Reinkulturen. Dabei handelt es sich nicht um Autolysenprodukte der Bakterienzellen, sondern um Produkte einer aktiven Sekretionstätigkeit der lebenden Zellen. Die Bakterien

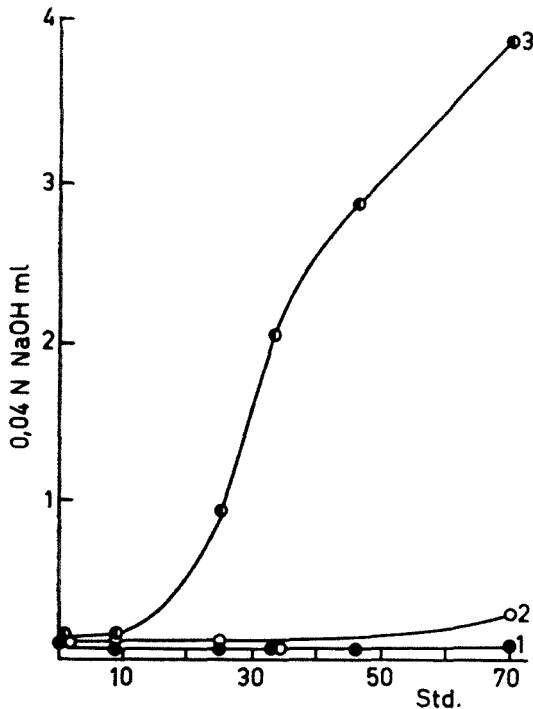


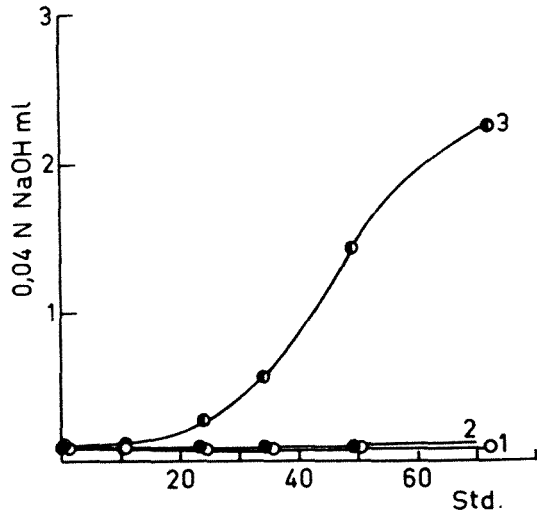
Abb. 1

Symbiotisches Wachstum von *Lactobacillus arabinosus* 17-5 und *Streptococcus faecalis* R in einer Nährlösung, die Phenylalanin und Folsäure nicht enthält.

1. *Lb. arabinosus* 17-5 (fordert Phenylalanin) allein.
2. *Str. faecalis* R (fordert Folsäure) allein.
3. *Lb. arabinosus* 17-5 und *Str. faecalis* R zusammen.

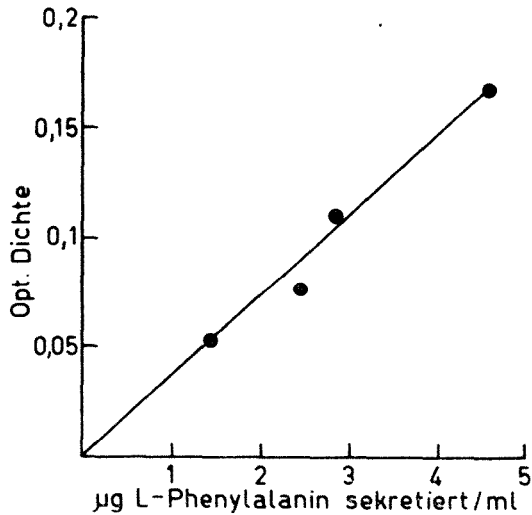
Abb. 2
Symbiotisches Wachstum von *Leuconostoc mesenteroides* P-60 und *Str. faecalis* R in einer Nährlösung, die Prolin, Phenylalanin, Glykokoll und Folsäure nicht enthält.

1. *Ln. mesenteroides* P-60 (fordert Prolin, Phenylalanin u. Glykokoll) allein.
2. *Str. faecalis* R (fordert Folsäure) allein.
3. *Ln. mesenteroides* P-60 und *Str. faecalis* zusammen.



brauchen auch nicht in direkter Berührung miteinander zu sein; denn man konnte beweisen, daß die symbiotischen Nahrungsbedingungen auch dann herrschten, wenn verschiedene Bakterienstämme mit einer Dialysenmembran voneinander getrennt waren. Die Abbildungen 1 und 2 stellen einige grundlegende Versuche von NURMIKKO dar, in denen zwei Milchsäurebakterien symbiotisch in derselben Nährlösung wachsen, in der sonst aus Mangel an bestimmten Aminosäuren und Vitaminen keines von beiden allein gedeiht. Aus den Abbildungen geht deutlich hervor, wie die beiden Symbionten einander mit den fehlenden essentiellen Nährfaktoren versorgen. Abb. 3 zeigt die Sekretion von L-Phenylalanin in die Nährlösung.

Abb. 3
Sekretion von L-Phenylalanin von *Streptococcus faecalis* R in die Nährlösung. L-Phenylalanin wurde bestimmt durch Anwendung von *Lb. arabinosus* 17-5 als Testorganismus.



Wenn man verschiedene Milchsäurebakterien so wählt, daß sie in ihrem Nahrungsbedarf einander ergänzen, können diese anspruchsvollen Bakterien als Mischkulturen in verhältnismäßig einfachen Nährlösungen wachsen.

Im Pansen kommen sowohl Bakterien vor, die eine Vielzahl von Nährfaktoren (Aminosäuren, Vitamine der B-Gruppe und noch andere Wachstumsfaktoren) benötigen, als auch bescheidene Bakterien, die mit Hilfe von Ammoniumstickstoff und mit Zucker oder anderen Kohlenstoffverbindungen als Kohlenstoffquelle wachsen. Diese synthetisieren die Nährfaktoren, die für die anspruchsvollen Bakterien essentiell sind, und sekretieren sie offensichtlich teilweise in die Flüssigkeit des Pansens. Die oben angeführten Resultate können mit größter Wahrscheinlichkeit auch auf die Mikrobenflora des Pansens sowie auf andere Mikrobenassoziate in der Natur angewandt werden.

Symbiotische Vorgänge sind viele Jahrzehnte in unserem Laboratorium Gegenstand des Interesses gewesen (z. B. die symbiotische Stickstoffbindung, deren komplizierter und wirkungsvoller Mechanismus erstaunlich ist). Auf die Wirksamkeit der Pansenmikroben wurde unsere Aufmerksamkeit besonders im Zusammenhang mit der Synthese des Milchproteins gerichtet^{2, 3)}.

Die Frage, ob die Mikrobenflora des Pansens Proteine aus Harnstoff und Ammoniumsalzen in einer Menge zu synthetisieren vermag, die sowohl zur Erhaltung des Tieres als auch für eine erhebliche Milchproduktion ausreichen würde, ist während der letzten zwei Jahre Gegenstand von Untersuchungen in unserem Laboratorium gewesen.

Das Protein bildet einen wesentlichen Teil im Futter des Milchviehs. Nach den üblichen Fütterungsnormen muß das Futter zusätzlich zu dem für die Erhaltung der Kuh erforderlichen verdaulichen Rohprotein (280—300 g/Tag) 60—70 g für jedes Kilogramm der erzeugten Milch enthalten, d. h. beinahe doppelt so viel wie ein Kilogramm Milch Protein enthält. Es würde somit aussehen, als ob es sich bei der Milcherzeugung nur um einen Umbau von Pflanzenprotein in biologisch wertvolleres Milchprotein handelte. Andererseits ist es innerhalb der letzten Jahrzehnte mehr und mehr klar geworden, daß auch Nicht-Proteinstickstoff an der Synthese des Mikrobenproteins im Pansen teilnimmt. ZUNTZ⁹⁾ in Deutschland hatte schon 1891 diese Auffassung ausgesprochen, und später haben viele Versuche in verschiedenen Ländern erwiesen, daß ein Teil des Proteins im Futter der Wiederkäuer durch Harnstoff oder Ammoniumsalze ersetzt werden kann.

Die Proteinmenge, die tatsächlich im Pansen aus Ammoniumstickstoff, zu welchem Harnstoff rasch gespalten wird, synthetisiert wird, ist nicht klar gewesen. Dies beruht hauptsächlich darauf, daß die Mikroben im Pansen teilweise die Futter-Proteine zu Ammoniak abspalten, teilweise aber aus Ammoniak wieder ihr Zellenprotein aufbauen, wodurch die abgespaltene Ammoniakmenge schwer zu bestätigen ist. Somit ist es auch unklar, welcher großer Anteil des Proteins im Futter durch den Vormagen verläuft und den Labmagen

erreicht. Bei in den USA mit wachsenden Lämmern, Ziegen und Färsen ausgeführten Fütterungsversuchen, in denen Harnstoff als einzige Stickstoffquelle verwendet wurde, hat man kein optimales Wachstum erreicht. Aus den Versuchen von LOOSLI et al.¹⁰⁾ (1949) ging schon hervor, daß alle Protein-Aminosäuren einigermaßen im Pansen synthetisiert werden. ELLIS und Mitarbeiter¹¹⁾ (1959) haben aus ihren Resultaten geschlossen, daß die Fähigkeit der Pansenmikroben, bestimmte essentielle Aminosäuren — nach ihnen Methionin und Tryptophan — zu synthetisieren, unzureichend für eine intensive Proteinsynthese ist. Das bescheidene Wachstum der Jungtiere, deren Proteinbedarf doch klein ist verglichen mit dem der milchproduzierenden Kuh, ist wahrscheinlich die Ursache dafür gewesen, daß vor 1962 keine Fütterungsversuche mit Harnstoff und Ammoniumsalz als einziger Stickstoffquelle für die Milcherzeugung ausgeführt worden sind.

In jenem Jahr wurden unsere Versuche an Milchkühen mit proteinfreier Fütterung angefangen. Bei einem früheren im Jahre 1959 ausgeführten Versuch, in dem einer normal gefütterten Kuh Ammoniumsulfat markiert mit ¹⁵N als einmalige Dosis verabreicht wurde, hatten wir schon festgestellt, daß alle Protein-Aminosäuren in Milch markiert wurden²⁾. Einige Aminosäuren, besonders das Histidin, waren jedoch viel schwächer markiert als die anderen. Es bestand die Möglichkeit, daß die Biosynthese der langsamer markierten Aminosäuren durch die Adaptation der Pansenmikrobenflora an die Verwendung von Ammoniumstickstoff als einziger Stickstoffquelle beschleunigt wurde und daß eine totale Synthese aller Proteinamino-säuren, die nicht nur für die Erhaltung der Kuh, sondern auch für eine fortdauernde Milcherzeugung ausreichend war, zustandegebracht werden sollte. Da die Fütterungsversuche mit laktierenden Kühen unter Anwendung von Harnstoff und Ammoniumsalzen als einziger Stickstoffquelle bereits über zwei Jahre fortgesetzt werden, kann man schon etwas über die Resultate berichten.

Der Versuch wurde mit zwei Ayrshire-Kühen, Eiru (Nr. 1) und Pella (Nr. 2) Anfang 1962 begonnen³⁻⁶⁾. Die Kühe wurden an die Versuchsfütterung während vieler Monate so gewöhnt, daß das Versuchsfutter in langsam steigenden Mengen das Normalfutter ersetzte. Die Versuchsfütterung bestand aus kleinen gepreßten Briketten, die gereinigte Stärke, Cellulose, Saccharose, ein Mineralsalzgemisch sowie Harnstoff und eine kleine Menge Ammoniumsulfat und Ammoniumphosphat enthielten. Der Wassergehalt der Brikette war 15% und Stickstoffgehalt 1,86% von Trockensubstanz, entsprechend 4% Harnstoff. Dazu wurde eine durchnäßte Paste, reich an Cellulose mit variierendem Gehalt an Harnstoff verabreicht. Kleine Mengen von Maisöl, später eine Mischung von Mais- und Leinöl wurden gegeben. An Vitaminen wurden nur A und D₂ plus D₃ in der Form kommerzieller Präparate verabreicht. Anfangs wurden 1 bis 3 kg Roggen- oder Weizenstroh zur Förderung des Wiederkäuens gegeben, später wurde es durch Cellulosestreifen, auf welche ein Kieselsäurenieder-schlag gefällt worden war, ersetzt. Die Rohfutterfrage ist durch

diese Cellulosestreifen noch nicht befriedigend gelöst; denn die Dauer des Wiederkäuens ist dabei noch sehr kurz, etwa 2 Stdn. pro Tag, während die Versuchskühe beim Füttern mit 1—2 kg Stroh/Tag 4—6 Stdn. wiederkäuen. Um die Speichelsekretion zu fördern, hat man die Versuchskühe an einem harten Gummischlauch kauen lassen. Die tägliche Portion einer der Versuchskühe, die 7—9 kg Milch pro Tag mit 6—7% Fett und 4—4,5% Protein liefern, ist in der folgenden Abbildung angegeben (Abb. 4). In der Fütterung der Versuchskühe sind also keine normalen Futtermittel mehr enthalten. Als Verunreinigung kommen natürlich sehr kleine Mengen verschiedener Substanzen in dem Versuchsfutter vor. Bei der jetzigen Fütterung, wo Kartoffelstärke an Stelle der Maisstärke verwendet wird, erhalten die Kühe etwa 99,5% Harnstoff- und Ammoniumstickstoff vom Totalstickstoff des Futters. Diese Prozentzahl war im ersten Versuchsjahr etwa 97.

Die Milchproduktion der vier ersten Versuchskühe während einer Laktationsperiode ist in Abb. 5 dargestellt *).

Während einer Laktationsperiode lieferten die Kühe durchschnittlich etwa 2000 kg Milch, welche 63—79 kg Protein enthielt. Der Fettgehalt der Milch von drei Kühen, Nr. 1, 2 und 3, war hoch, 6,1, 5,4 und 5,9%, der Proteingehalt ebenfalls verhältnismäßig hoch, bei denselben Kühen 3,7, 3,8 und 3,4%. Die Milch der vierten Kuh enthielt nur 4,0% Fett und 3,2% Protein. Die Zusammensetzung der erzeugten Milch — in unserem Laboratorium als Nullmilch (0-Milch) bezeichnet — entsprach derjenigen von normalgefütterten Kühen, wenn die quantitativ wichtigsten Bestandteile, das heißt Fett, fettfreie Trockenmasse, Zucker, Gesamtprotein und Casein, berücksichtigt werden. Allgemein kann man sagen, daß 0-Milch 15—30% fettreicher war als die Milch, welche dieselben Kühe unter Normalfütterung früher produzierten.

Die Produktion der Versuchskuh Eiru (Abb. 6) während einer Laktationsperiode (3. 10. 1962 bis 10. 12. 1963) war 2141 kg Milch, die 6,1% Fett und 3,7% Protein enthielt. Auf der Energiebasis berechnet, entspricht diese fettreiche Milch 2730 kg Normalmilch mit 4,0% Fett und auf der Proteinbasis 2410 kg Normalmilch mit 3,2% Protein. Während der folgenden Laktationsperiode (11. 12. 63 bis Kalbung etwa 30. 12. 64) wird die Produktion wahrscheinlich bis auf 2000—2100 kg etwa 5,8% ige Milch steigen. Die bisherige Produktion während der ganzen Versuchszeit (25. 4. 1962 bis 18. 9. 1964) ist 4317 kg Milch mit 5,8% Fett und 3,7% Protein gewesen, was auf der

*) Pella starb am 14. März 1963 zwei Monate vor dem Kalben infolge eines Unfalls. Ela (Nr. 4) starb am 9. März 1964 gerade vor dem Kalben (ein gut entwickeltes, 34 kg schweres Kuhkalb). Die Ursache des Todes: Schwefelwasserstoffvergiftung. An dieser Vergiftung starben auch zwei Färsen, die eine 18½ Monate alt am 14. April 1964 und die andere 12 Monate alt am 17. Februar 1964. Den Kühen wurden längere Zeit 10 g und den Färsen 5 g Schwefelpulver pro Tag gegeben, um die Biosynthese der schwefelhaltigen Aminosäuren möglicherweise zu fördern. Einige Tiere bestanden diese Schwefeldosen, andere nicht. Die überriechenden Rülps hörten auf, als die Fütterung von Schwefel beendet wurde, sowie auch die Blähungsfälle, die ab und zu eingetreten waren.

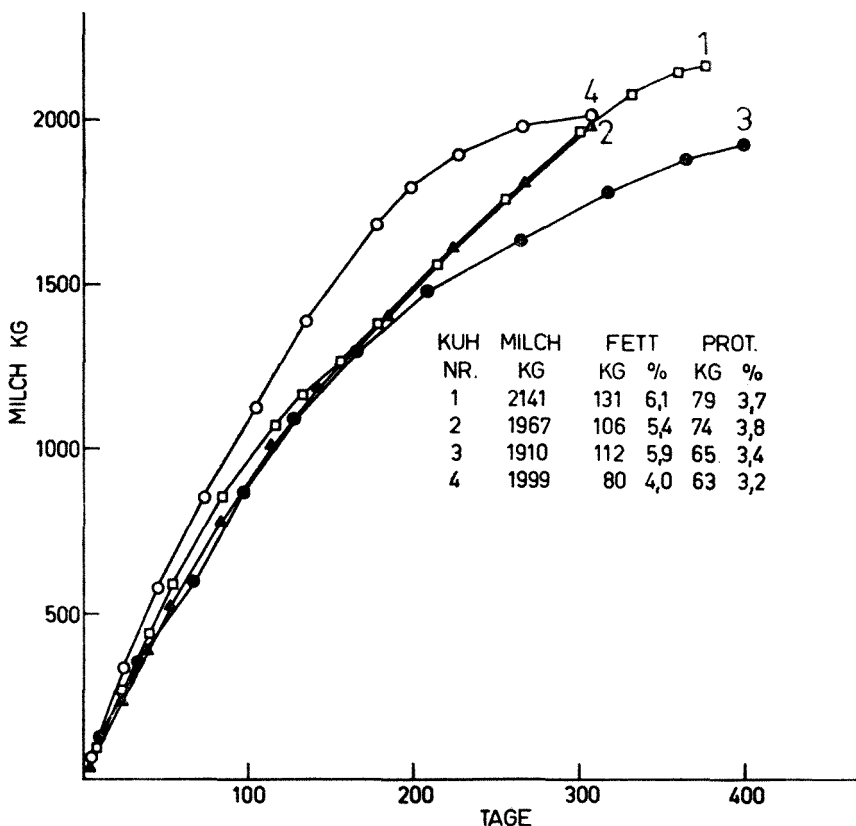


Abb. 5

Milchproduktion der vier ersten Versuchskühe während einer Laktationsperiode.

Energiebasis 5400 kg Milch mit 4,0% Fett und auf der Proteinbasis 5000 kg Milch mit 3,2% Protein entspricht (Abb. 7).

Die Brunst ist während der Versuchsfütterung normal und die Fruchtbarkeit befriedigend gewesen. Die meisten Kühe wurden nach ein oder zwei Beschälungen trächtig, und die Kalben sind gut entwickelt und kräftig gewesen. Mehrere Kälber sind unter Versuchsfütterung gut gewachsen (Gewichtszunahme im Alter von 5 bis 9 Monaten etwa 0,8 kg/Tag). Abb. 8 zeigt eine Aufnahme der Kuh Eiru nach 2¹/₂jähriger Versuchsfütterung, Abb. 9 die Fotografie der Versuchskuh Aino nach 1³/₄jähriger Versuchsfütterung.

Man konnte keine entscheidenden Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des Gesamtproteins zwischen 0-Milch und bei normaler Fütterung produzierter Milch feststellen. Die Bestimmung der Aminosäuren wurde nach der Säurehydrolyse des Totalproteins unter Anwendung eines automatischen Aminosäureanalysators ausgeführt. Zahlreiche Aminosäureanalysen, die zu verschiedener Zeit

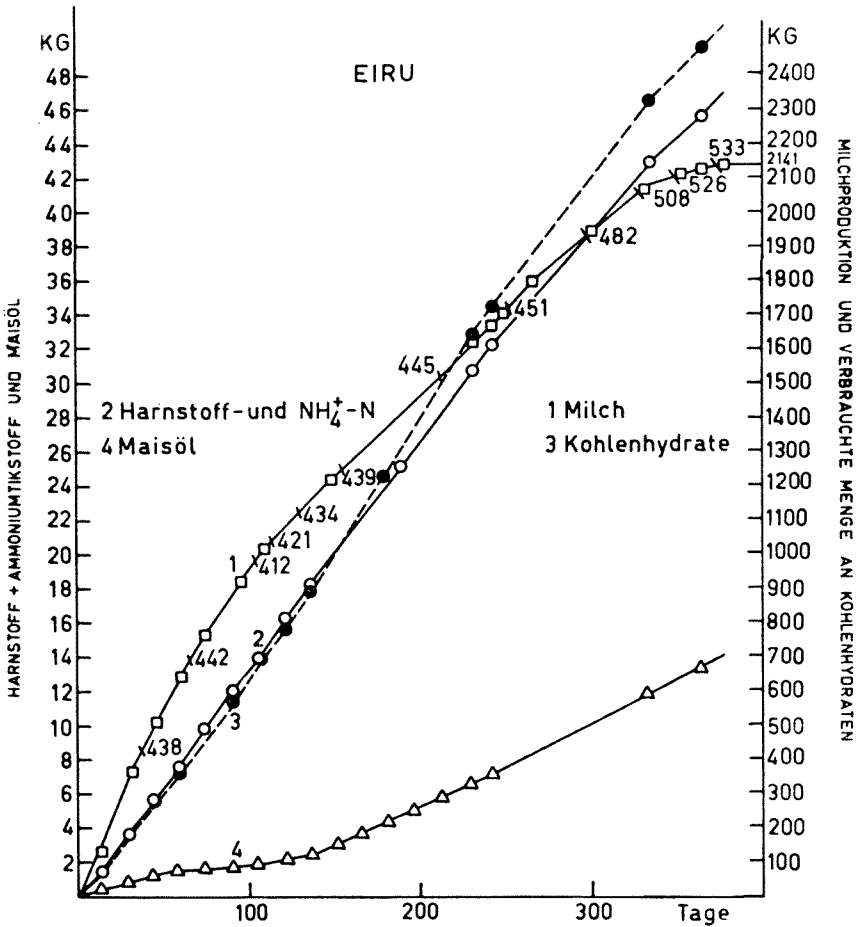


Abb. 6

Milchproduktion und Futtereinnahme der Kuh Eiru während einer Laktationsperiode. Gewicht der Kuh (3stellige Zahlen), Verbrauch an Kohlehydraten (Skala auf der rechten Seite) und an Stickstoff und Maisöl (Skala auf der linken Seite).

ausgeführt wurden, führten zu ähnlichen Resultaten (Tab. 1). Wir können somit sagen, daß die Aminosäurezusammensetzung von 0-Milch derjenigen von Normalmilch entspricht⁵⁾.

Die Fraktionierung der Proteine der 0-Milch und derjenigen der Normalmilch auf einer DEAE-Säule hat ähnliche Fraktionen in beiden Fällen gezeigt⁶⁾ (Abb. 10). Die Methode der Fraktionierung braucht noch weitere Entwicklung, aber die schon erzielten Resultate zeigen eine große Ähnlichkeit der Proteine der 0-Milch und Normalmilch.

Nach 8 Bestimmungen wäre die Verdaulichkeit von Harnstoff- und Ammoniumstickstoff durchschnittlich etwa 65% gewesen. Die

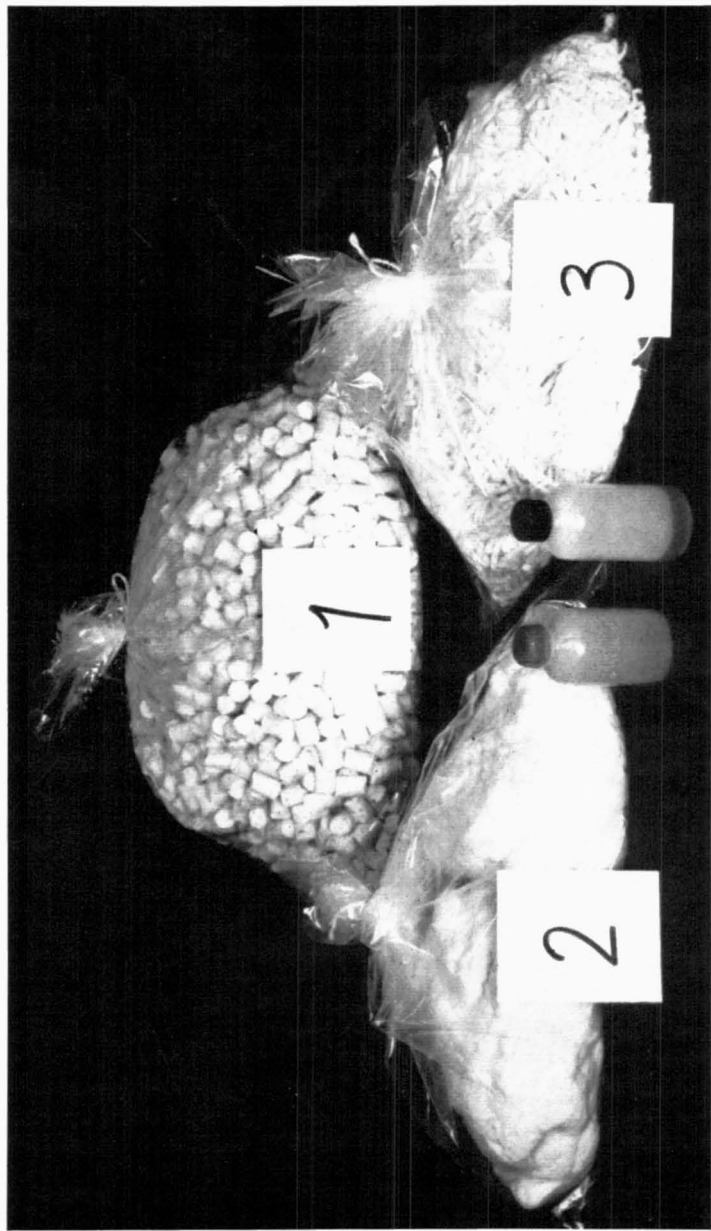


Abb. 4

Zusammensetzung der täglichen Futterportion der Versuchskub Aino in 1964, als die tägliche Produktion 7—9 kg Milch mit 6,5—7% Fett und 4,5% Protein war (= 11—12 kg 4prozentige Milch)

7 kg Brikette (6,0 kg Trockensubst., 245 g Harnstoff)

11 kg Cellulosereiche Paste (2,8 kg Trockensubst., 145 g Harnstoff)

5 kg Cellulosestreifen imprägniert mit Kieselsäure (1,3 kg Trockensubst., 50 g Harnstoff)

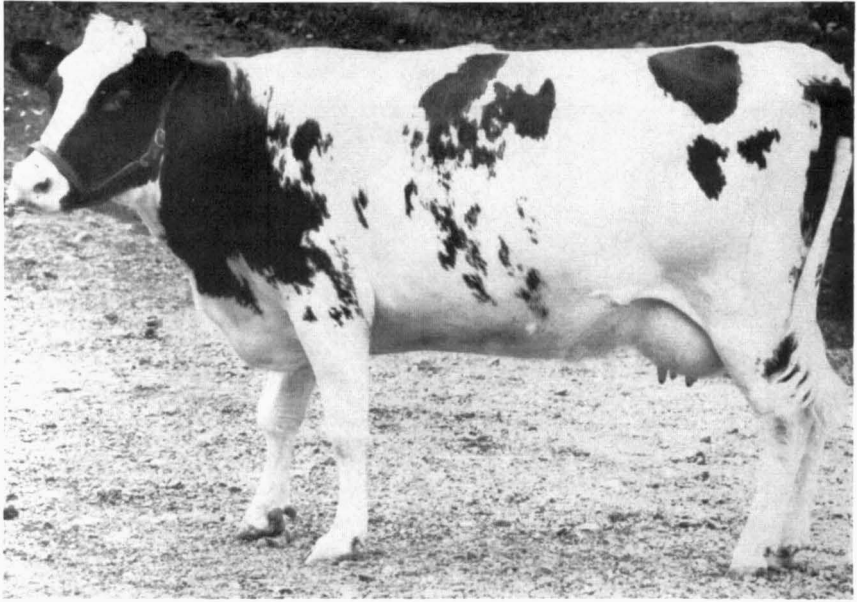


Abb. 8
Kuh Eiru, fotografiert am 4. August 1964.

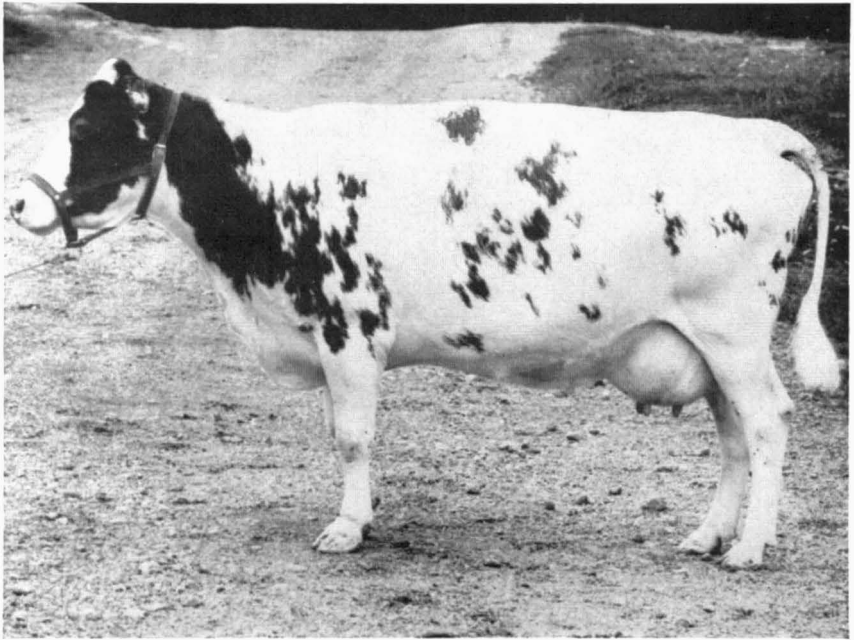


Abb. 9
Kuh Aino (Nr. 3 in Abb. 5), fotografiert am 4. August 1964.

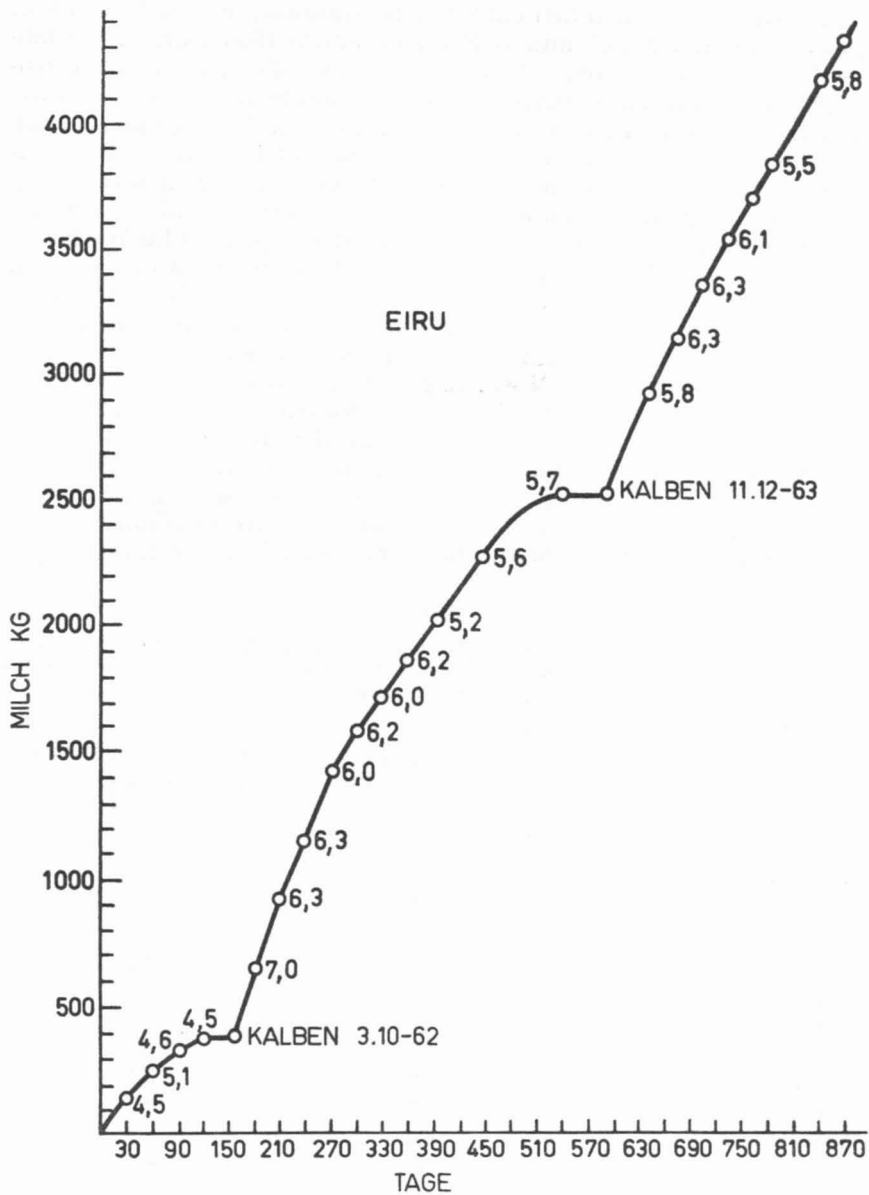


Abb. 7

Bisherige Milchproduktion der Kuh Eiru während der ganzen Versuchszeit (25. 4. 1962 bis 18. 9. 1964). Die Zahlen bedeuten Fettprozent der Milch. Eiru wird Ende Dezember dieses Jahres das dritte Mal während der Versuchsfütterung kalben.

Unterschiede zwischen den einzelnen Bestimmungen sind jedoch sehr groß (Grenzwerte 60,1 und 73,2%). Im Jahre 1963 wurden Verdaulichkeitskoeffiziente 60,1—63,9, neulich aber 69—73 gefunden, wonach eine bedeutende Steigerung der Verdaulichkeit des Stickstoffs während der Versuchsfütterung stattgefunden hätte (vgl. unten). Nach den üblichen Fütterungsnormen sollte eine 450 kg schwere Kuh täglich 285 g verdauliches Rohprotein zur Erhaltung und dazu etwa 60 g für jedes Liter Milch erhalten. Unsere ersten Versuchskühe Eiru und Pella produzierten während 271 Tagen 1816 resp. 1819 kg Milch und 65,5 resp. 69,8 kg Protein, also durchschnittlich 6,7 kg Milch/Tag mit 242 resp. 258 kg Protein. Der eingenommene verdauliche Stickstoff entsprach ziemlich genau dem in Milch sekretierten und zur Erhaltung erforderlichen Protein (bei Eiru: eingenommen 88,1 g verd. N, sekretiert in Milch 37,9 g N = 242 g Protein, zur Erhaltung geblieben 50,2 g verd. N = 313 g verd. Protein, insgesamt 555 g Protein; bei Pella: eingenommen 85,7 g verd. N, sekretiert in Milch 40,6 g N = 258 g Protein, zur Erhaltung geblieben 46,1 g verd. N = 288 g Protein, insgesamt 546 g Protein. Der bei den Berechnungen gebrauchte Verdaulichkeitskoeffizient von Harnstoff- und Ammoniumstickstoff ist jedoch unsicher (s. oben). Die Verwendbarkeit der Chromoxyd-

Tabelle 1

Aminosäurezusammensetzung vom hydrolysierten Total-Protein der O-Milch und Normalmilch. Die Zahlen bedeuten den Anteil der betreffenden Aminosäuren (N % von Total-N)

	O-Milch (Versuchskuh Eiru) Tot. Protein	Milch von 20 Kühen unter Normalfütterung Tot. Protein
Methionin	2,8	2,8
Asparaginsäure	7,3	7,2
Serin	4,9	4,7
Threonin	4,3	4,4
Glutaminsäure	18,8	18,3
Prolin	9,3	9,4
Glykokoll	1,8	1,8
Alanin	3,3	3,4
Cystein	0,7	0,7
Valin	6,3	6,4
Isoleucin	5,2	5,3
Leucin	9,5	9,6
Tyrosin	5,0	5,1
Phenylalanin	4,8	4,9
Lysin	7,9	8,1
Histidin	2,8	2,7
Arginin	3,7	3,7
Tryptophan	1,5	1,5

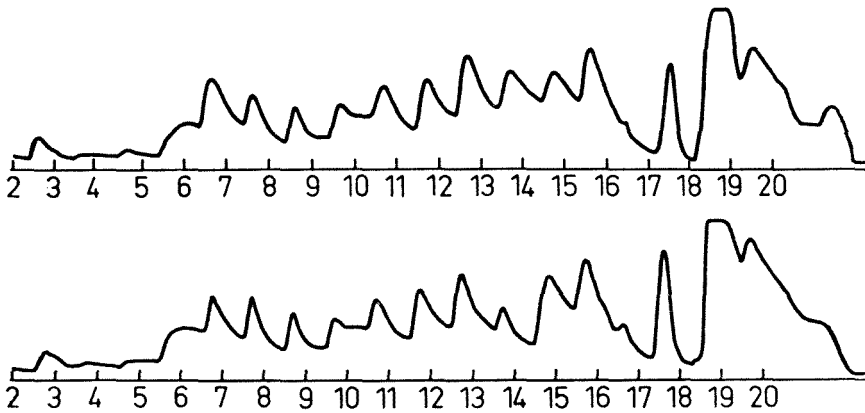


Abb. 10

Fraktionierung der Proteine von O-Milch und von Milch, produziert mit üblichen Futtermitteln. Oben: O-Milch, unten: Normal-Milch.

methode zur Bestimmung der Verdaulichkeit des Stickstoffs bei unserer Versuchsfütterung ist noch zu kontrollieren, da der Geruch der ziemlich geruchlosen Faeces während der Zufuhr von Chromoxyd widrig wurde.

Auf den hohen Effekt von Harnstoff wirkt sicherlich teilweise die Sparsamkeit im Stickstoffhaushalt, die sich in stark erniedrigter Ausscheidung des Harnstoffs in Urin zeigt. Wenn der Stickstoffgehalt des Urins bei normaler Fütterung der Milchkühe durchschnittlich 0,7—0,8% beträgt, enthält der Urin unserer Versuchskühe nur 0,1 bis 0,3% Stickstoff.

Die proteinähnlichen, durch Säurehydrolyse zu Aminosäuren abspaltbaren Stickstoffverbindungen in den Faeces, die darin etwa 70% vom Gesamtstickstoff bilden, scheinen unverdauliche Bakterienproteine zu sein, da sie außer Protein-Aminosäuren auch einige andere, besonders Diaminopimelinsäure enthalten. In den Faeces von normal gefütterten Kühen sind derartige Stickstoffverbindungen in viel kleinerprozentigen Mengen gefunden worden.

Die Totalsynthese des Proteins aus Harnstoff- und Ammoniumstickstoff, wenn das unverdauliche Mikrobenprotein mitberechnet wird, war während der neunmonatigen Versuchsperiode bei Kuh Eiru durchschnittlich 756 g und bei Kuh Pella 740 g pro Tag. Die maximale Synthese während der höchsten Milchproduktion betrug etwa 900 g Protein/Tag.

Nachdem der Versuchskuh Eiru als Einzeldosis Harnstoff markiert mit ^{15}N nach halbjähriger Versuchsfütterung gegeben worden war, untersuchten wir die Markierung der Aminosäuren im Protein der Milch und versuchten somit, die Geschwindigkeit der Synthese verschiedener Aminosäuren aufzuklären⁵⁾. Die Resultate sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Versuch mit ^{15}N -markiertem-Harnstoff (0,693 g ^{15}N) 20. 10. 62, Versuchskuh Eiru. Milchproduktion 20. Okt. 12,8 kg, 21. Okt. 11,4 kg, 22. Okt. 11,8 kg. Milchproben 6,3, 20, 30 und 44 Stdn. nach der Zufuhr von markiertem Harnstoff (KREULA, MOISIO, VIRTANEN).

Rechts die entsprechenden Werte von LAND und VIRTANEN nach Verfütterung von $^{15}\text{NH}_4$ -Sulfat im Zusammenhang mit Normalfütterung. At % Überschuß ^{15}N .

	Diese Arbeit nach				LAND u. VIRTANEN nach	
	6,3 Stdn.	20 Stdn.	30 Stdn.	44 Stdn.	15 Stdn.	25 Stdn.
Tot-N	0,080	0,102	0,069	0,051		
Prot.-N	0,078	0,108	0,073	0,049	0,039	0,032
Rest-N	0,042	0,061	0,090	0,118		
Amid-N	0,130	0,100	0,065	0,031	0,07	0,039
Glu	0,098	0,112	0,073	0,056	0,054	0,030
Asp	0,090	0,125	0,078	0,058	0,047	0,037
Tyr	0,072	0,123	0,085	0,052	0,042	0,036
Ala	0,068	0,081	0,045	0,048	0,047	0,038
Ser	0,081	0,104	0,064	0,050	0,038	0,031
Threo	0,045	0,113		0,055		
Gly	0,070	0,045	0,028		0,044	0,033
Val	0,058	0,110	0,068	0,054	0,032	0,032
Pro	0,065	0,109	0,068	0,057	0,026	0,023
Lys	0,075	0,132	0,089	0,062	0,029	0,031
Met	0,070	0,114	0,060	0,054	0,033	0,029
Leu	0,056	0,101	0,065	0,055		
Ileu	0,068	0,100	0,063	0,056		
His	0,038	0,083	0,053	0,041	0,008	0,009
Phe	0,058	0,087	0,041		0,027	0,027
Arg	0,059	0,098		0,054	0,022	0,022
Cys		0,040	0,039	0,044		0,018

Massenspektrometrische Bestimmungen 6,3 Stdn. nach der Zufuhr des markierten Harnstoffes zeigten, daß Histidin die schwächste Markierung von allen Aminosäuren in den Milchproteinen hatte und seine Synthese aus Harnstoff-Stickstoff deswegen am langsamsten war. Nach Histidin folgt Threonin. Glutaminsäure, die eine primäre nicht-essentielle Aminosäure ist, wurde am stärksten markiert. Der Unterschied zwischen der Markierung des Histidins und der Glutaminsäure ist jedoch viel kleiner als in dem obenerwähnten früheren Versuch (LAND und VIRTANEN²⁾), bei dem einer normal gefütterten Kuh $^{15}\text{NH}_4$ -Sulfat gegeben wurde. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die Markierung des Histidins in unserem gegenwärtigen Versuch nach einer so kurzen Zeit wie 6,3 Stdn. schon 39% von derjenigen der Glutaminsäure und 76% nach 20 Stdn. war, während die entsprechenden Prozentzahlen in den früheren Versuchen bei einer normal ge-

fütterten Kuh nur 15 nach 15 Stdn. und 30 nach 25 Stdn. waren. Die Gewöhnung der Kuh (eigentlich der Pansenmikroben) an Harnstoff und Ammoniumstickstoff als einzige Stickstoffquelle hat offenbar die Synthese des Histidins kräftig und in einem kleineren Umfang des Threonins, Phenylalanins, Lysins, Arginins und einiger anderer Aminosäuren erhöht. Die kräftige Synthese des Milchproteins ist somit möglich geworden, wie aus unseren Fütterungsversuchen hervorgegangen ist. Die langsamere Synthese des Histidins und einiger anderer essentiellen Aminosäuren dürfte sogar bei unseren daran gewöhnten Kühen den Engpaß bei der Proteinsynthese bilden. Die Resultate beweisen diese Hypothese jedoch nicht.

Der Vitamingehalt der 0-Milch wurde dauernd durch Bestimmung der Vitamine der B-Gruppe unter Anwendung mikrobiologischer Methoden verfolgt^{5, 6}). Tabelle 3 zeigt unsere Analysenresultate.

Die mikrobielle Synthese der Vitamine der B-Gruppe im Pansen ist, aus dem hohen Vitamingehalt der 0-Milch zu schließen, kräftig gewesen. Der Riboflavin-, Nicotinsäure- und Pantothen säuregehalt war im allgemeinen höher in 0-Milch als in Normalmilch. Thiamin-, Pyridoxin-, Folsäure-, Biotin- und B₁₂-Gehalt befanden sich auf etwa gleichem Niveau wie in Normalmilch. Die Biosynthese der Vitamine der B-Gruppe erscheint somit groß genug zu sein, um den normalen Vitamingehalt der Milch zu unterhalten.

Einer von den Gründen, die zu unseren Fütterungsversuchen mit gereinigter Energienahrung und Harnstoff als Stickstoffquelle führten, war, den speziellen Geruch und Geschmack der Milch festzustellen ohne die Wirkung der vielen Geschmacks- und Geruchsstoffe, die vom üblichen Futter stammen. Nach den organoleptischen Bestimmungen sind Geschmack und Geruch der 0-Milch in erstaunlichem Maße denjenigen der Normalmilch ähnlich. Eine gaschromatographische Analyse zeigt freilich Unterschiede zwischen 0-Milch und Normalmilch in flüchtigen Substanzen, aber die Unterschiede scheinen keine größere Wirkung auf den Geschmack und Geruch der Milch zu haben.

Der einzige Bestandteil der Milch, in dessen Zusammensetzung wir bemerkenswerte Unterschiede zwischen der 0-Milch und Normalmilch gefunden haben, ist Fett. Wie bekannt, beruht die Zusammensetzung des Milchfetts in hohem Grade auf der Fütterung und der Zusammensetzung des im Futter enthaltenen Fetts. Der größte Teil der Fettsäuren des Milchfetts wird jedoch aus flüchtigen Fettsäuren, besonders aus der Essigsäure, synthetisiert, die sich im Pansen durch die Vergärung der Kohlehydrate bilden. Unsere Versuchsfütterung enthielt kein anderes Fett als das zugesetzte. Somit ist die Versuchsfütterung für die Untersuchungen über die Biosynthese des Milchfetts *in vivo* geeignet. Die verfütterte Fettmenge hatte keine Wirkung auf die Produktion des Milchfetts, wie aus dem hohen Fettgehalt der 0-Milch hervorgeht, unabhängig von der Menge des verabreichten Fetts. Wenn eine solch kleine Menge wie 6,6 g Maisöl pro Tag einer der Versuchskühe während einer Periode von 47 Tagen gefüttert wurde, lieferte sie durchschnittlich 473 g Fett pro Tag, also 70mal mehr als

Tabelle 3

Vitamingehalt der Milch der Versuchskühe und der Milch aus zwei Landgütern, µg/100 ml

Herkunft der Milch	Thiamin	Riboflavin	Nicotinsäure	Pyridoxin	Folsäure	Biotin	Pantothen-säure	Ascorbin-säure	Cholin
Pella	55 (42—70)	364 (321—403)	160 (131—221)	42 (36—52)	2,5	4,2	564	2867 (2400—3500)	17,8 (17,0—18,5)
Eiru	54 (37—84)	394 (293—520)	224 (198—259)	51 (40—64)	2,3 (1,6—2,7)	5,1 (2,6—8,0)	946 (825—1067)	2683 (2500—2900)	20,7 (18,4—23,0)
Ela	47 (34—58)	340 (222—450)	235 (207—270)	136 (96—176)	3,3 (3,2—3,4)	3,8 (2,5—5,0)	723 (520—910)	2233 (2100—2500)	14,0
Aino	43 (31—51)	339 (267—423)	253 (188—281)	87 (65—109)	3,4 (2,9—3,9)	2,4 (1,9—3,3)	671 (276—1070)	2075 (2000—2200)	15,4
Landgut 1	48 (32—58)	234 (209—267)	158 (118—195)	68 (49—80)	3,3 (3,0—3,9)	4,2 (3,1—5,6)	322 (230—430)	2260 (2000—2400)	18,5 (17,3—19,6)
Landgut 2	57	199	119	65		2,1		2100	20,3

gefüttert worden war. Am Ende dieser Periode war der Linolsäure- und Linolensäuregehalt des Milchfetts niedrig, nämlich 0,91% vom Totalfett. Das war auch zu erwarten, da diese ernährungsphysiologisch wichtigen Fettsäuren nicht im Tierorganismus und, soweit bekannt, auch nicht in Bakterien synthetisiert werden. Der Gehalt an Ölsäure war auch sehr niedrig, etwa 8%, und an Stearinsäure weniger als 1%. Der Gehalt an Palmitinsäure war dagegen sehr hoch, über 50%. Wenn 18,5 g Maisöl und dieselbe Menge an Leinöl die tägliche Fettportion ausmachten, wurden der Fettgehalt der Milch und die Fettproduktion nicht erhöht. Der Linol- und Linolensäuregehalt stieg bis 2—3%, der Ölsäuregehalt ein wenig. Die entsprechenden Werte des normalen Milchfetts sind: Stearinsäure 10—13%, Ölsäure 25—30% und Palmitinsäure 27—35%. Der wesentliche Unterschied zwischen der Zusammensetzung des Fetts der 0-Milch, bei deren Produktion wenig Fett gefüttert wurde, und der Normalmilch besteht darin, daß der Gehalt an C₁₈-Säuren niedrig und an C₁₆-Säure hoch in der erstgenannten ist. Einige andere Unterschiede sind dazu noch in der Zusammensetzung des Fetts der beiden Milchtypen zu finden. Die Biosynthese der C₁₈-Säuren scheint sehr schwach zu sein, und man sollte viel mehr Fett mit hohem Gehalt an ungesättigten C₁₈-Säuren füttern als bisher, damit die Zusammensetzung des Fetts der 0-Milch dem der Normalmilch ähnlicher wird. Untersuchungen über die Biosynthese des Fetts der Pansenmikroben und des Organismus der Kuh sind im Gang.

Die Zusammensetzung der Mikrobenflora des Pansens der Versuchskühe ist wesentlich verschieden von derjenigen der normalgefütterten. In der ersteren sind die Protozoen beinahe verschwunden, die Anzahl der Bakterien dagegen gewaltig, etwa um das 50-fache, angestiegen. Die Aminosäure- und Proteinsynthese im Pansen der Versuchskühe ist so schnell, daß man sehr wenig Ammoniak im Pansen vorfindet. Wir haben in zahlreichen Proben vom Panseninhalt Werte von 0,7 bis 10,6 mg Ammoniak pro 100 ml Panseninhalt gefunden. Bei Normalfütterung ist der Ammoniakgehalt des Pansens viel höher (11,1—26,6 mg/100 ml) als bei Versuchsfütterung, obwohl das Futter im ersten Fall hauptsächlich Protein enthält. Harnstoff wird im Pansen so schnell abgebaut, daß in den meisten Proben des Panseninhalts nur Spuren davon vorzufinden sind.

Ein Schema von der Verwertung von Protein- und Nicht-Proteinstickstoff bei der Kuh ist in Abb. 11 dargestellt.

Unsere Fütterungsversuche an Milchkühen mit proteinfreier Fütterung haben die enorme synthetische Kapazität der Mikrobenflora des Pansens gezeigt. Zukünftige Versuche werden zeigen, in welchem Maße die Proteinsynthese noch vermehrt werden kann. Die bisher erreichte Milchproduktion ermöglicht schon die Untersuchung vieler Probleme, welche die Funktion des Pansens und die Bildung verschiedener Bestandteile der Milch betreffen.

Die physikalische Konsistenz des Panseninhalts und das Wiederkauen sind von großer Bedeutung für die Verwertung des Futters. Die homogene breiartige Masse, welche den Panseninhalt unserer

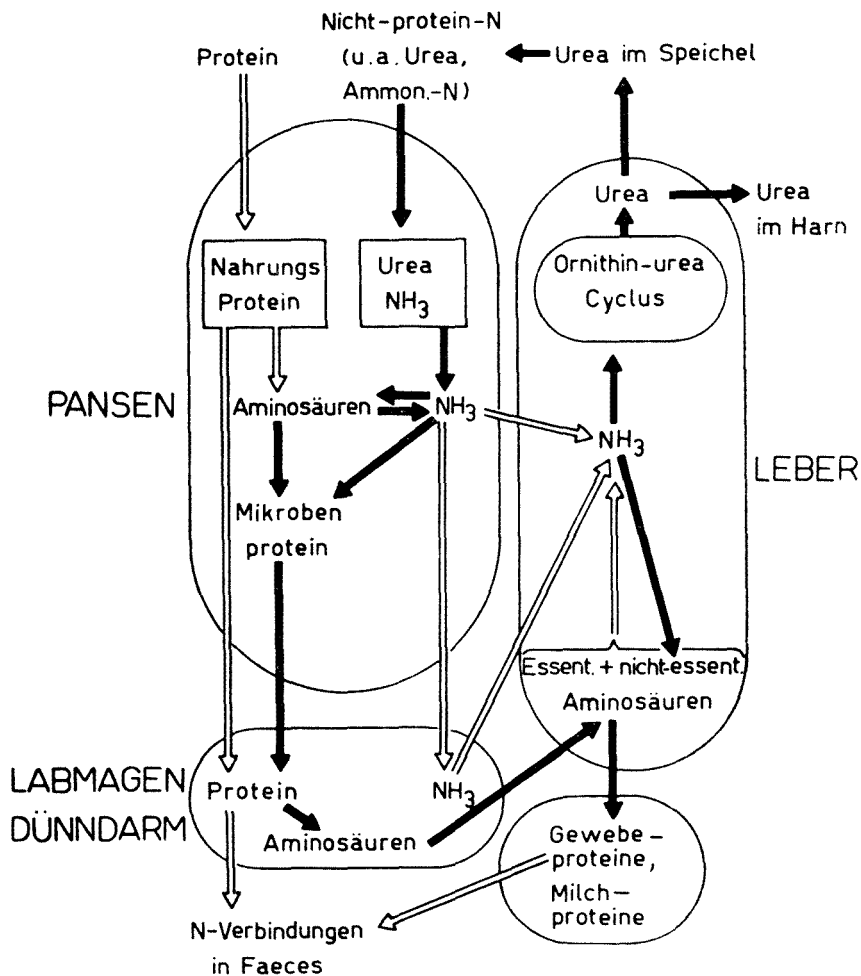


Abb. 11

Schema der Verwertung von Protein- und Nicht-Proteinstickstoff bei der Kuh.

Versuchskühe bildet, ist nicht die günstigste für die Funktion des Pansens. Deswegen erhöht der Zusatz von Stroh zu unserer proteinfreien Diät die Milchproduktion, sogar 1 kg Stroh pro Tag hat eine günstige Wirkung auf die Funktion des Pansens gehabt. Da unsere Absicht war, Milch unter Anwendung von gereinigten Nährstoffen zu erzeugen, verwendeten wir Stroh nur im Anfang unseres Versuches. Im Falle, daß eine proteinfreie Fütterung in die Praxis umgesetzt würde, wäre es leicht, genügend schwerverdauliches Pflanzenmaterial bereitzustellen. Die schwere Aufgabe liegt darin, billiges, gut verdauliches, für die Fütterung der Kühe geeignetes Kohlenhydratmaterial zu erhalten. Wenn dies gelingt, können sich neue Möglichkeiten

für eine Milchproduktion in weiten Gebieten der Erde eröffnen, wo Mangel an essentiellen Aminosäuren und Vitaminen herrscht. Im Augenblick kann nichts über diese Möglichkeiten gesagt werden.

Jedenfalls haben unsere Versuche gezeigt, daß die Kuh, die eines der ältesten Haustiere des Menschen ist, imstande ist, sich sogar den allerneuesten Bestrebungen des Menschen, hochwertige Proteine nur unter Anwendung von einfachen Stickstoffverbindungen zu erzeugen, anzupassen.

Literatur

1. NURMIKKO, V., *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A. II.*, No. 54 (1954).
2. LAND, H. und VIRTANEN, A. I., *Acta Chem. Scand.* 13, 489 (1959).
3. VIRTANEN, A. I. und LAMPILA, M., *Suomen Kemistilehti B*, 35, 244 (1962).
4. VIRTANEN, A. I., *Suomen Kemistilehti B*, 36, 83 (1963).
5. VIRTANEN, A. I., *Biochem. Z.*, 338, 443 (1963).
6. VIRTANEN, A. I., *Umschau*, 63, 770 (1963).
7. VIRTANEN, A. I., *Deutsches Mediz. J.*, 14, 788 (1963).
8. VIRTANEN, A. I. und SYVÄÖJA, E.-L., *Suomen Kemistilehti B*, 37, 134 (1964).
9. ZUNTZ, N., *Pflüger's Arch. ges. Physiol.*, 49, 483 (1891).
10. LOOSLI, J. K., WILLIAMS, H. H., THOMAS, W. E., FERRIS, F. H. und MAYNARD, L. A., *Science*, 110, 144 (1949).
11. ELLIS, W. C., FLYNN, L. M., HARGUS, W. A. und PFANDER, W. H., *Federation Proc.*, 18, 1 (1959).