

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

## ROODE ADEREN IN GOUDSCHE KAAS

DOOR

J. VAN BEYNUM <sup>1)</sup>

(Ingezonden 26 Mei 1933.)

In de laatste jaren is verschillende malen door de praktijk de aandacht van het Rijkslandbouwproefstation gevestigd op diverse kleurgebreken in zuivelproducten. Daar afwijkende verkleuringen aan de zuivel een onooglijk aanzien geven, daalt de marktwaarde ervan sterk, waarom verschillende van deze gebreken nader onderzocht zijn geworden en de resultaten hiervan in deze verslagen medegedeeld.

Wat boter betreft worden de kleurige vlekken veroorzaakt door schimmels, zooals b.v. blauw-groene vlekken door de bekende penceelschimmel, *Penicillium glaucum*, donker groene vlekken door *Cladosporium herbarum* <sup>2)</sup> en roode vlekken door *Epicoccum* <sup>3)</sup>.

Bij de Nederlandsche kaassoorten treft men verkleuringsverschijnselen aan op de korst en in het zuivel. Op de korst zijn het onregelmatige vlekken met onscherpe begrenzing van blauwe of rood-bruine kleur. De blauwe verkleuringen moesten toegeschreven worden aan de werking van bepaalde schimmelsoorten, die met ijzerverbindingen, in de korst aanwezig, een blauwe kleurstof vormen <sup>4)</sup>. De roodbruine verkleuringen van de korst hebben een meer algemeene ontstaansoorzaak. Zij worden n.l. gevormd door de altijd aanwezig zijnde schimmels, indien de kaas door niet-zorgvuldige behandeling „dik in het beslag zit”. Door een vochtige bewaarplaats wordt de inwerking der schimmels op de kaaskorst zeer bevorderd, zoodat deze sterk aangetast wordt. Vooral bij boerderijkaas komt dit gebrek tamelijk veel voor, wegens het gemis aan voor kaas geschikte bewaarplaatsen.

<sup>1)</sup> Dit onderzoek werd nog voor een gedeelte verricht door F. W. J. BOEKHOUT.

<sup>2)</sup> F. W. J. BOEKHOUT, Over beschimmelde boter. *Jaarverslag der Ver. tot Expl. cener Proefzuivelboerderij te Hoorn*, 1918, 31.

<sup>3)</sup> F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM, Roode vlekken op beschimmelde boter. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij*, 1930, 1. *Versl. van landbouwk. Onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 36 (1930), 1.

<sup>4)</sup> F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM, Over een kaasschimmel. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij*, 1922, 95. *Versl. van landbouwk. Onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 28 (1923), 113.

2082735

Voor verkleuringen in het zuivel is in een vroeger verslag reeds melding gemaakt van de groene en bruine randzônes, die hun ontstaan danken aan de inwerking van uit nitraat gevormd nitriet op het kaaseiwit <sup>1)</sup>.

Enkele jaren geleden werden wij door den Rijkszuivelconsulent voor Zuidholland opmerkzaam gemaakt op een ons nog onbekend kleurgebrek in Goudsche kaas. Het gebrek is uitwendig aan de kaas niet merkbaar, doch blijkt eerst bij het doorsnijden, waar men op het snijvlak roode, tamelijk scherp begrensde, meest lijnvormige verkleuringen waarneemt, die de kaas daar ter plaatse een roodgeaderd aanzien geven. Dikwijls zijn deze adertjes sterk gelocaliseerd, soms treft men ze door de geheele kaasmassa aan. Het wekt bij beschouwing sterk den indruk of de in oudere kaas voorkomende fijne scheurtjes opgevuld zijn met een roode stof, waarvan de kleur veel overeenkomst met kaaskleursel vertoont.

De fotografieën, fig. 1 en 2, geven een tweetal der in het begin van 1930 uit de praktijk ontvangen kazen met dit gebrek te zien, waaruit zeer duidelijk de aderige structuur blijkt.

Daar de roode adertjes bij voorzichtig verwarmen van de in water verdeelde kaasmassa met loog als vliesjes op den bodem der reageerbuis bezonken, werd bij het opsporen van de oorzaak van dit gebrek eerst gedacht aan stoffen, die eventueel de wrongel zouden hebben kunnen verontreinigen. De roode massa bestond evenwel niet uit ijzerverbindingen, daar de ijzerreactie in de roode aderen niet sterker was dan in de blanke deelen van de kaas. Ook bestond de mogelijkheid van mechanische verontreiniging. Mechanische verontreiniging komt in de Goudsche kaas in vele gevallen voor wegens het gebruik van met zwevende deeltjes verontreinigd water in die streken, waar slecht water voor het nawarmen van de wrongel gebezigd wordt. De donker gekleurde zwevende deeltjes uit het toegevoegde water bezinken op de wrongellaag, tengevolge waarvan later in de kaas donker gekleurde lijnen op het snijvlak worden gevonden.

Met het oog op deze mogelijkheid werden de roode adertjes microscopisch onderzocht, waarbij een zeer merkwaardig resultaat werd verkregen. In het microscopisch preparaat, dat van de zich in de adertjes bevindende roode stof werd gemaakt, werden namelijk uitsluitend bacteriën gevonden, zoodat blijkbaar de fijne spleetjes in het zuivel gevuld of volgegrocid waren met een rein-cultuur van staafvormige gekleurde bacteriën.

---

<sup>1)</sup> F. W. J. BOEKHOUT, W. VAN DAM en J. VAN BEYNUM, Over het ontstaan van salpeterranden in kaas. *Jaarverslag Proefzuivelboerderij*, 1925, 1. *Verslagen van landbouwk. Onderz. der Rijkslandbouwproefstations*, 31 (1926), 1.

Er werd nu getracht de betreffende bacteriënsoort te isoleeren, waarvoor van het verkleurde deel der kaas oppervlaktecultures werden aangelegd op Löffler-gelatine (alkalische vleeschwater-pepton-gelatine met  $\frac{1}{2}\%$  glucose) en op Wei-gelatine. Deze cultures gaven evenwel het gewone beeld van een kaasflora te zien, d.w.z. er kwamen op de platen slechts kleine koloniën voor van het type der melkzuurbacteriën. Vele ervan waren hoogstens iets lichtgeel van kleur. Slechts daar, waar een toevallige gistkolonie de kleine koloniën bedekte, kon iets van de vorming van een rood-oranje kleurstof bemerkt worden.

Een duidelijker resultaat werd verkregen door anaerobe cultuur. Een weinigje der roode stof werd gesuspenderd in steriel water en hiermede buizen Löffler- en Wei-gelatine geënt, die na de enting werden luchtledig gepompt en dichtgesmolten. Na 5 dagen bij  $21^{\circ}$  C werden hierin gekleurde koloniën gezien, die na 10 dagen volledig uitgegroeid waren en een diep oranje-roode kleur hadden.

Voor het verkrijgen van een reïncultuur werd de gelatine voorzichtig gesmolten en uitgegoten in een steriele cultuurschaal, waarop na de stolling roode koloniën werden afgeënt en gesuspenderd in steriel water. Van deze suspensies werden wederom in verschillende verdunningen anaerobe cultures aangelegd en dit enkele malen herhaald. De aldus verkregen reïncultures worden behouden door ze op dezelfde wijze over te enten in Wei-gelatine, hetgeen iedere maand of om de twee maanden kan geschieden. Aldus hebben wij sedert Maart 1930 een aantal stammen van deze bacteriesoort in cultuur kunnen houden zonder eenige verandering, ook in de kleurstofproductie, op te merken.

Uit alle door ons ontvangen kazen, die het aderebrek vertoonden, konden op deze wijze de roode bacteriën gemakkelijk geïsoleerd worden. In een enkel geval werd reeds direct bij de enting van het roode materiaal uit de kaas een cultuur van uitsluitend roode koloniën verkregen, in andere gevallen waren in de eersaangelegde cultures nog een grooter of kleiner aantal witte koloniën aanwezig van de gewone in kaas voorkomende melkzuurbacteriën. Figuur 3 geeft een fotografie van de betreffende roode bacteriën. Ook is een fotografie opgenomen (Fig. 4) van koloniëncultures in luchtledige buizen.

Van de eigenschappen van deze bacterie is de kleurstofvorming het meest opvallend. Zij vertoont eenige typische eigenaardigheden. Het vermogen om de rood-oranje kleurstof te vormen is niet altijd aanwezig, tengevolge waarvan de bacterie soms aan de aandacht zou kunnen ontsnappen. Het is daarom gewenscht de bovenbeschreven isoleeringstechniek te volgen. De voorwaarden, welke aanwezig moeten zijn, wil de bacterie tot kleurvorming overgaan, zijn niet systematisch bestudeerd. Er is gebleken, dat in de eerste plaats de afwezigheid van zuurstof noodzakelijk is voor het ontstaan der kleur. De koloniën van

op gelatine aangelegde oppervlaktecultures zijn hoogstens lichtgeel gekleurd, evenals streepcultures op zoogenaamde schuine buizen. Anaerobe cultures in weigelatine vormen koloniën, die bij 21° C in de eerste dagen eveneens lichtgeel zijn, maar welke na 3 tot 4 dagen met de vorming van hun typische kleur aanvangen. De invloed der zuurstof wordt zeer duidelijk gedemonstreerd bij een proef, waarbij in een diepe laag weigelatine in een cultuurbuis een steekcultuur wordt aangelegd en daarna de gelatine door een laag gesteriliseerde paraffineolie van de lucht wordt afgesloten. Na eenige dagen bij 21° is de steekcultuur uitgegroeid en heeft een diep oranje-roode kleur onder in de buis en een lichtgele dicht onder de paraffineolie, waar door diffusie nog toetreding van zuurstof in beperkte mate mogelijk is. Het tusschenliggende deel der steek vertoont overgangstinten.

Bij het ouder worden van deze cultuur neemt de lengte van het gekleurde deel af. De bacteriën zijn dan in het medium uitgegroeid, waardoor zij de voor de kleurvorming noodzakelijke reductietoestand niet meer kunnen handhaven. Dit verbleeken van ouder worden cultures geeft een aanwijzing, dat het uitblijven van kleuring bij kweken aan de lucht niet een kwestie is van beïnvloeding van het kleurstofvormend vermogen van de bacteriën door lucht-zuurstof, doch dat dit eerder geweten moet worden aan een vernietiging van gevormde kleurstof door zuurstof. Anaerobe koloniëncultures behouden hun krachtige kleur ook nadat de koloniën volledig uitgegroeid zijn. Zelfs na maanden lang bewaren heeft in zulke cultures de kleur niets van haar intensiteit ingeboet.

Door kweken aan de lucht gaat het vermogen tot kleurvorming niet verloren. Bij afenten der bijna ongekleurde koloniën van een oppervlaktecultuur in weigelatine en kweken in anaerobe omstandigheden treedt de kleur wederom op, zoodat zonder gevaar de koloniëncultuur op een weigelatineplaat gebruikt kan worden ter contrôle op reinheid.

Het is hierdoor duidelijk, dat in het anaerobe milieu van de Nederlandsche kaassoorten de bacterie haar sterk rood-oranje kleur kan vormen.

Dat de afwezigheid van zuurstof bij overigens gelijkblijvende voedingsomstandigheden niet de eenige voorwaarde voor kleurproductie is, blijkt uit het resultaat van vloeistofcultures. Het is ons n.l. niet gelukt om in eenige vloeistof onder anaerobe omstandigheden kleuring te verkrijgen. Terwijl de bacteriën in Löffler-gelatine (anaerob) sterk gekleurd zijn, blijven zij in Löfflerbouillon (eveneens anaerob gekweekt) ongekleurd of hoogstens lichtgeel. Het bezinksel in de vloeistofcultures vertoont slechts zelden een spoor van roode of oranje verkleuring. Zoo ook blijven de bacteriën ongekleurd in anaerobe cultures in melk en wei, hoewel in melk- en weigelatine de kleuring buitengewoon krachtig is. Daar uit deze proeven een invloed van den vasten bodem

scheen te volgen is ook getracht of agarbodems in staat waren gekleurde koloniën te doen ontstaan. In weïagar bleven de koloniën evenwel hoogstens lichtgeel, zoodat waarschijnlijk een groote eiwitconcentratie, zooals die in 10% gelatine en in kaas aanwezig is, voor de kleur van belang is. Toch werd ook in een vloeïstof met 10% pepton Witte en 1% glucose geen kleur verkregen. Wel wordt een duidelijk zwakkere pigmentering gevonden in weïgelatine met geringere gelatineconcentraties (5 en 3%).

In kunstmatige voedingsbodems werd de sterkste kleur verkregen in weïgelatine en in Löfflergelatine, waaruit blijkt, dat suiker (in de genoemde bodems resp. melksuiker en glucose) een bevorderenden invloed heeft. Vermoedelijk echter is de invloed der suiker op de kleurstofvorming secundair, daar toch in kaas die een geheel suikervrije bodem biedt, krachtige kleurvorming is te constateeren. Indien echter, zooals hierboven aannemelijk gemaakt is, de reductietoestand in het milieu het ontstaan van kleur in de hand werkt, dan wordt het duidelijk, dat een stof als suiker, die een sterk groeibevorderende werking heeft, de bacteriën in een reincultuur in staat stelt het vereischte reductieniveau te bereiken. Zoo treedt in een anaerobe cultuur in pepton-Ca-lactaatgelatine geen kleur op. De bacterie groeit hierin zeer langzaam en kan dus ook geen krachtige reductietoestand scheppen. In kaas daarentegen, waarin ook slechts langzame groei kan zijn, wordt een gunstig reductieniveau verwekt door de normale flora van melkzuurbacterien, waardoor zelfs bij langzamen groei kleur kan gevormd worden.

Melk is voor deze chromogene bacterie een goede voedingsbodem, hoewel ook hierin de ontwikkeling eenigszins traag verloopt. Het meest opmerkelijke proces in melk is de zuurvorming. De hoeveelheid gevormd zuur is zóó groot, dat de melk tot stremming gebracht wordt. De traagheid der ontwikkeling blijkt uit het feit, dat bij 21° C, na ongeveer twee maanden het einde van het zuringsproces bereikt wordt. Bij 30° is dit ongeveer 14 dagen à 3 weken. Een volledig uitgezuurde cultuur titreert dan per 10 cc 9 à 9½ cc n/10, dat is dus een zuurgraad van dezelfde orde van grootte als door de gewone zuurselduplococcen in melk gevormd wordt (circa 9 cc n/10 per 10 cc). Na een maand cultuur bij 21° is de titer ongeveer 8 cc n/10.

Het belangrijkste stofwisselingsproduct in melk is melkzuur, hetgeen aangetoond werd door enkele kleurreacties en bereiding van zouten uit het aetherextract. Het bereide Calciumzout had een Ca-gehalte overeenkomstig dat van Ca-lactaat. Een oplossing van dit Calciumzout in water vertoonde in den polarimeter geenerlei draaiing, terwijl het verkregen zinklactaat 18,04% kristalwater bevatte. In de melkcultures wordt dus inactief melkzuur gevormd.

Naast melkzuur wordt bovendien nog vluchtig zuur aangetroffen. Bij ana-

lyse volgens de destillatiemethode in de cultuurvloeistof zelf <sup>1)</sup> werd hiervoor azijnzuur gevonden in een hoeveelheid van 18 cc n/10 per 100 cc melk. Deze hoeveelheid komt overeen met het azijnzuurgehalte van cultures in melk van aromabacteriën. Op grond hiervan is daarom bepaald of, evenals bij aromabacteriën, een toevoeging van citroenzuur aan de melk, een hooger gehalte aan azijnzuur ontstaat <sup>2)</sup>. Dit bleek echter niet het geval te zijn. Vermogen tot citroenzuuraantasting bezit de roode bacterie evenwel toch in beperkte mate.

Als derde product der suikerontleding wordt koolzuur gevormd. In centrifugemelk b.v. werd na een maand per 100 cc cultuur 55 mg koolzuur gevonden.

Bij kweeken in melk doet zich de eigenaardigheid voor, dat in de rein-cultuur eenige differentiatie optreedt. In koloniëncultures, op het oppervlak van weigelatine aangelegd van materiaal uit een melkcultuur, hebben niet alle koloniën hetzelfde uiterlijk, zoodat men in twijfel komt over de reinheid der betreffende cultuur in melk. De normale koloniën zijn rond en iets geel van kleur, de abnormale iets platter en minder gekleurd en bezitten soms korte uitloopers. Dit verschijnsel heeft zich in den loop der jaren, dat de bacterie in reincultuur is, steeds herhaald, zoodat de reinheid der stammen als onverdacht te beschouwen was. Bovendien geven alle koloniën, normale zoowel als abnormale, teruggeënt in weigelatine in luchtledige buizen weer gekleurde koloniën, zij het dat de intensiteit der kleuring eenigermate uiteenloopt.

De mogelijkheid van het zich ontwikkelen van bacteriën in kaas wordt bepaald door de geschiktheid van den voedingsbodem, in hoofdzaak dus door hun tolerantie ten opzichte van zuurgraad, zoutgehalte en zuurstofgebrek. Wat het zoutgehalte betreft kan de roode bacterie het kaasmilieu zeer goed verdragen. Zoowel in aerobe als in anaerobe cultures werd met drie verschillende stammen nog groei geconstateerd in neutrale Löfflerbouillon met 8 gewichtsprocenten keukenzout. Bij 9% trad geen groei meer op. De ontwikkelingsnelheid hangt wel sterk af van de zoutconcentratie, doch is bij de in kaas voorkomende normale concentratie van 5 - 6% nog zeer groot.

Ook tegen een hoogen zuurgraad is de roode bacterie zeer goed bestand. Van 3 stammen, geënt in neutrale Löfflerbouillon, waaraan 0,5, 0,6, 0,7 en 0,8% melkzuur was toegevoegd, waren er twee, die in de vloeistof met 0,7% melkzuur, waarvan de pH 3,7 was, nog een zeer geringe ontwikkeling

<sup>1)</sup> J. VAN BEYNUM, *Verlagen van landbouwk. Onderz.*, 1933, 39c, 57. *Jaarverslag der Ver. tot Expl. eener Proefzuivelboerderij*, 1932.

<sup>2)</sup> HAMMER, Volatile acid production of *S. lacticus* and the organisms associated with it in starters. *Agr. Exp. Stat. Iowa St. Coll. of Agr. and mech. arts, Bulletin* 63 (1920).

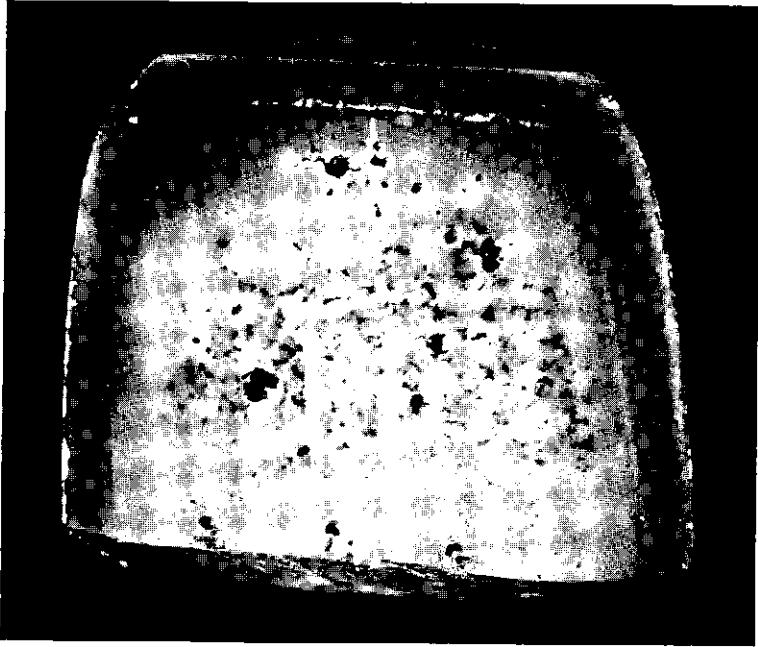


FIG. 1.  
Doorsnede van kaas met roode aderen uit de praktijk.

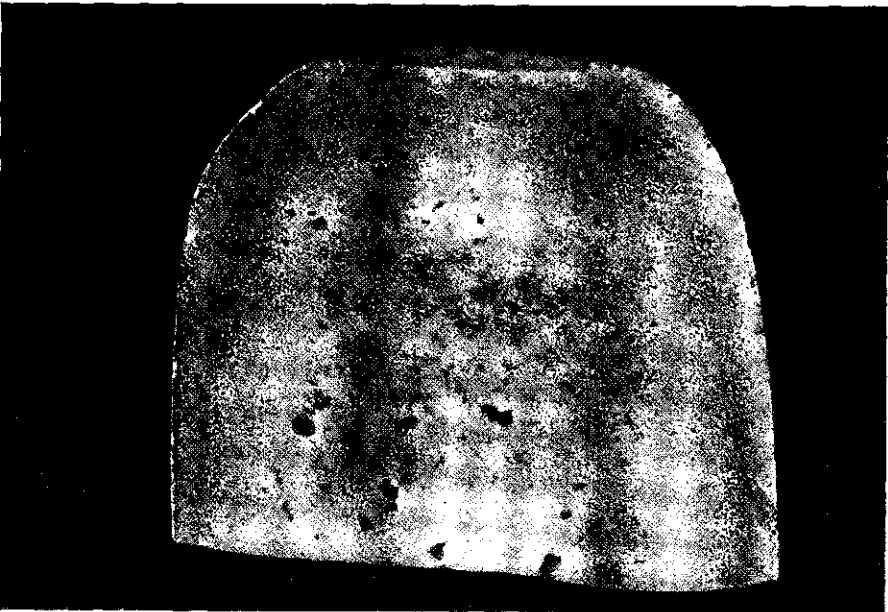


FIG. 2.

Idem, opgenomen op kleurenplaat.



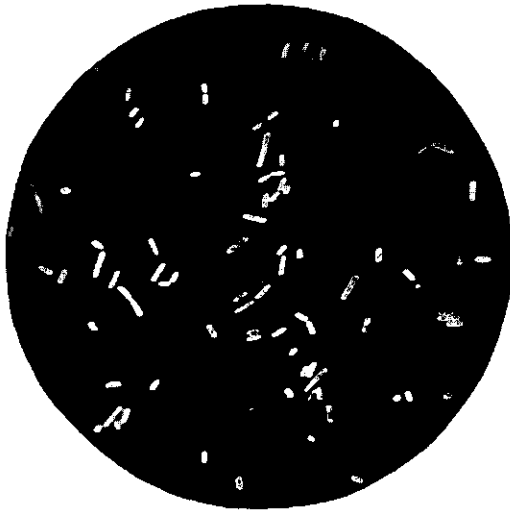


FIG. 3.  
Roode bacteriën, 1000 maal vergroot.  
Tusche-preparaat.

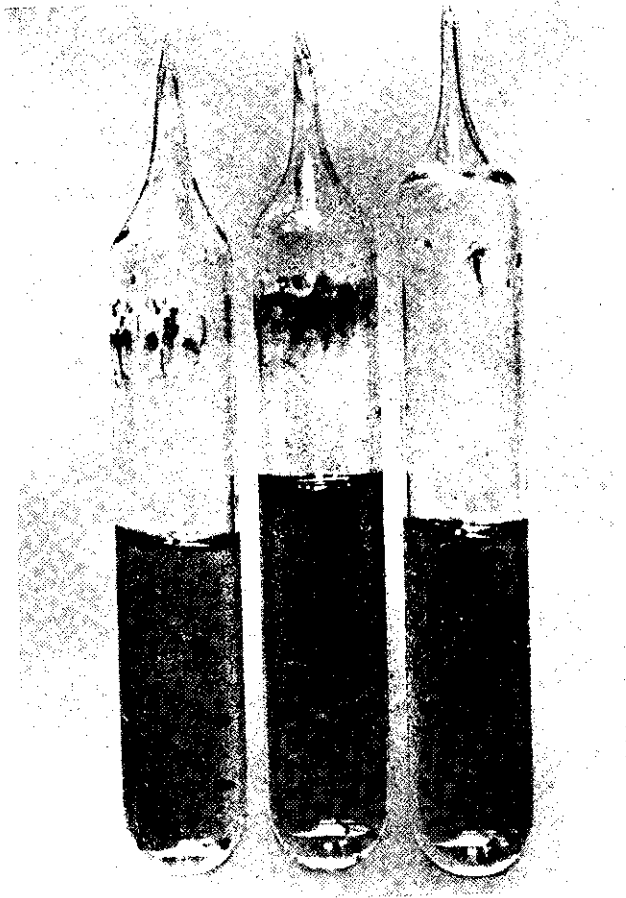


FIG. 4.

Koloniëncultuur der roode bacterie in luchtledige  
buizen met weigelatine.

te zien gaven. Het snel gezuurde en gezouten kaasmilieu biedt dus de mogelijkheid tot een langzamen groei, gelijk ook nader experimenteel is aangetoond kunnen worden.

De flora in goed bereide kaas is zeer beperkt. Zelfs rekeninghoudend met de slechtste infectiekansen der te verkazen melk, vindt men practisch in het inwendige slechts melkzuurbacteriën, boekelscheurbacteriën, colibacteriën (cf *Bact. lactis aerogenes*) en boterzuurbacteriën. Het leek dus waarschijnlijk dat de roode bacterie tot een dezer groepen zou behooren en, gezien den vorm (staafje), het gemis van gelatinevervloeiend vermogen en de onbeweeglijkheid, was het reeds à priori te verwachten, dat het een melkzuurbacterie was. Het voorkomen van staafvormige melkzuurbacteriën in oudere kaas is geheel normaal. Door den langzamen groei der melkzuurbacteriënstaafjes in de kaas en het geleidelijk afsterven der melkzuurstreptococcen is de verhouding van deze twee bacteriëntypes in oude kaas ten voordeele van de staafjes verschoven. De roode bacterie gedraagt zich in kaas dus als de normaal voorkomende staafvormige melkzuurbacteriën. Toch kan hier ook sprake zijn van een propionzuurbacterie, te meer waar er chromogene propionzuurbacteriën bekend zijn, o.a. beschreven door THÖNI en ALLEMANN <sup>1)</sup> en VAN NIEL <sup>2)</sup>. Evenals deze vormt ook de roode bacterie geen sporen, tengevolge waarvan de bacterie bij lage temperatuur kan worden gedood. De doodingstemperatuur bij verhitting gedurende 10 minuten in op lakmoes neutrale Löfflerbouillon bedroeg 54° à 55° C.

In jonge cultures der roode bacterie zijn de bacteriën grampositief, evenals melkzuur- en propionzuurbacteriën. Daar echter katalase ontbreekt en geen gisting optreedt in pepton-Ca-lactaat-voedingsvloeistof, terwijl in melk bijna uitsluitend melkzuur en geen propionzuur wordt gevormd, moet de roode bacterie dus beschouwd worden als een chromogene melkzuurbacterie.

Hiermede komen ook kolonietype en -grootte op oppervlaktecultures overeen. De koloniën op weigelatine kunnen een diameter van ongeveer 0,5 mm bereiken. In anaerobe cultures in weigelatine worden de koloniën grooter en kunnen wel een diameter van circa 2 mm bereiken, hetgeen met de gewone melkzuurbacteriën niet het geval is.

Roode bacterieele verkleuringen in het inwendige van kaas zijn in andere landen en andere kaassoorten reeds vroeger opgemerkt. Een der laatste verhandelingen hierover "Rusty spot in Cheddar and other cheese" van

<sup>1)</sup> THÖNI en ALLEMANN, *Centralblatt f. Bakt.* II, 25 (1910), 8.

<sup>2)</sup> VAN NIEL, *The propionic acid bacteria.* Diss. Delft, 1928.

DAVIS en MATTICK <sup>1)</sup> bespreekt het voorkomen, de isolatie en de eigenschappen van een bacterie, welke roestkleurige koloniën in de kaasmassa doet ontstaan. In vele opzichten komt deze, ook een melkzuurbacterie, met de hierboven beschrevene, uit Goudsche kaas geïsoleerde, overeen, doch zijn ook verschillen aan te wijzen.

Daar het gebrek zeer weinig voorkomt is het niet mogelijk geweest de herkomst der roode bacteriën vast te stellen. Eenige pogingen om de infectiebron op te sporen zijn zonder resultaat gebleven. De zeldzaamheid van het voorkomen van roode adertjes in kaas doet het echter waarschijnlijk zijn, dat in de geobserveerde gevallen de infectie slechts toevallig kan zijn geweest, zooals het meer geschiedt dat ergens plotseling een ongewone bacterie verschijnt. In dit geval is ter bestrijding van het gebrek alleen een grondige schoonmaak van alle bij de zuivelbereiding betrokken instrumenten in staat de besmetting van de kaas op te heffen.

---

<sup>1)</sup> *Journal of dairy research*, 1 (1929), 50, 136, en 2 (1931), 190.

## SUMMARY.

**A bacterial colour defect in Gouda cheese.**

In 1930 our attention was drawn to a colour defect in the inner of Gouda cheese. When cut with a knife, the fresh surface showed a considerable number of short, red coloured lines, very much like veins. Microscopical examination revealed that these veins consisted of a compact mass of bacteria. By plating on whey-gelatine however no red colonies could be obtained. Only in anaerobic cultures in whey-gelatine colonies of a bright red orange colour developed. The formation of the pigment depends on some factors, which have not been studied in detail, but of which the absence of oxygen is the most important one. The organism develops in aerobic (surface-) cultures just as well as lactic acid streptococci, but the red pigment is not formed, because of its destruction by the oxygen of the air. The pigment is only produced in solid media; liquid cultures never showed a distinct pigmentation.

The organism, a rod form, belongs to the group of lactic acid bacteria, non-motile, grampositive, katalase negative, non-liquefying. Cultivated in milk, it produces from the carbohydrate inactive lactic acid, acetic acid and carbon dioxide. It develops very slowly in milk. The acidity amounts to 9—9,5 cc n/10 per 10 cc of milk after two months incubation at 20° C. At 30° C. it grows more rapidly. When plating a pure culture of this bacterium in milk on whey-gelatine a differentiation appears to have taken place as different types of colonies are observed. This cannot be ascribed to cultural impurities, for each colonytype forms again the red pigment, when cultivated anaerobically again, though the intensity of the red colour may vary somewhat.

This investigation was still worked out for a part by F. W. J. BOEKHOUT.