

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN

VERDERE ONDERZOEKINGEN OVER DE BEWARING
VAN MELK EN ROOM ONDER ZUURSTOFDRUK

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE

(Ingezonden: 25 Mei 1939)

1. Vorige onderzoekingen

Bij onze eerste onderzoekingen ter bestudeering van het Hofius-procédé ter conserveering van melk (1) kwamen wij tot de conclusie, dat bij bewaring van melk of room onder zuurstofdruk de bacterieele flora tijdens de bewaring sterk verandert. De bacteriën, die zich bij gewoon bewaren ontwikkelen, sterven onder den zuurstofdruk sneller of langzamer af. Daarnaast treedt evenwel groei op van een speciale bacteriesoort uit de groep der melkzuurbacteriën, tengevolge waarvan na zekeren tijd de flora der onder zuurstofdruk bewaarde melk bijna uitsluitend uit deze voor zuurstof weinig gevoelige melkzuurbacteriën bestaat. Daar het afsterven der bacteriën van de gewone melkflora in den aanvang snel geschiedt en later steeds langzamer, doch de groei der voor zuurstof weinig gevoelige bacteriën zeer langzaam begint en later toeneemt, vertoont het verloop van het totaal aantal bacteriën in de melk het karakteristieke beeld van een daling, gevolgd door een stijging.

Wij kwamen verder tot de conclusie, dat de temperatuur en de grootte van den zuurstofdruk grooten invloed hebben op het kwantitatieve verloop van den bacterieelen toestand der melk. Hoe hooger de bewaringstemperatuur en hoe lager de zuurstofdruk is, des te eerder wordt de groei der voor zuurstof weinig gevoelige bacteriën merkbaar en des te grooter wordt het eind-aantal van deze bacteriën.

De betreffende bacteriën veroorzaken in de melk weinig verandering. Slechts indien zij in groot aantal aanwezig zijn (b.v. meer dan 1 000 000 per ml) wordt een geringe stijging van den zuurgraad der melk geconstateerd en wordt een zurige smaak aan de melk merkbaar.

Het onderzoek kon met de in de eerste mededeeling besproken proefnemingen nog niet als afgesloten worden beschouwd. In het volgende worden de uitkomsten medegedeeld van proeven, welke eensdeels dienden als aanvulling op die in ons eerste artikel, anderdeels echter als voortzetting van het onderzoek beschouwd kunnen worden.

2. Zuurstof als conserveermiddel

Wij hebben het in de eerste plaats wenschelijk geoordeeld alsnog te bevestigen, dat inderdaad de conserveerende werking in het Hofius-procédé door de zuurstof veroorzaakt wordt en dat bijvoorbeeld stikstof onder dezelfde omstandigheden niet in staat is het bacterieel bederf van de melk tegen te houden. Bij deze proefneming werd de melk (gemengde versche rauwe volle melk) gekoeld tot 4° C en verdeeld over 2 vertind koperen tanks en 1 geëmailleerd vat, gesloten met een niet hermetisch afsluitend deksel. In de eene tank werd de bovenstaande lucht met zuurstof verdreven en de melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebracht. In de andere tank werd hetzelfde met stikstof gedaan. De 3 vaten werden bij 4°—5° C geplaatst en van tijd tot tijd werden monsters genomen voor het onderzoek. De behandeling der tanks en de monsterneming geschieden op de wijze als vroeger beschreven. Als gewoonlijk werden de tanks en het geëmailleerde vat dagelijks geschud. De monsters uit het geëmailleerde vat met contrôlemelk (welke dus gewoon aan de lucht bewaard werd) werden met een gesteriliseerde pipet genomen.

De resultaten van deze proef vindt men opgegeven in tabel 21. Het kiemgetal, opgegeven per ml, werd bepaald door telling van het aantal koloniën, gegroeid in glucose-pepton-vleeschagar van pH 7,0. De titer stelt voor het aantal ml $\frac{n}{10}$ loog, noodig voor neutralisatie (indicator phenol-phtaleïne) van 100 g melk.

TABEL 21

Melk op verschillende wijzen bij 4°—5° C bewaard. 1 November 1938

	Contrôlemelk, gewoon bewaard			Melk onder 10 atm. stikstof-overdruk			Melk onder 10 atm. zuur- stofoverdruk	
	Kiemgetal	Coli	Titer	Kiemgetal	Coli	Titer	Kiem- getal	Titer
Bij vulling .	38 500		20,0	38 500		20,0	38 500	20,0
Na aanbren- gen gasdruk.				676 000	4,5		701 000	
Na 2 dagen	38 400	4,5	20,0	699 000	4,5		446 000	20,0
" 4 "	220 000		20,2	410 000	110	20,0	126 000	20,0
" 6 "	8 900 000	4,0	21,0	1 600 000	750	21,0	15 000	20,4
" 8 "	37 000 000	60	23,4	6 600 000		20,8	21 500	20,6
" 10 "	120 000 000	95	23,8	13 850 000	2 500	21,0	12 100	20,6
" 13 "	323 000 000	1 500	34,0	112 000 000	110 000	25,8	5 000	23,2

Deze resultaten zijn, voorzover kiemgetal en titer betreft, grafisch voorgesteld in figuur 13.

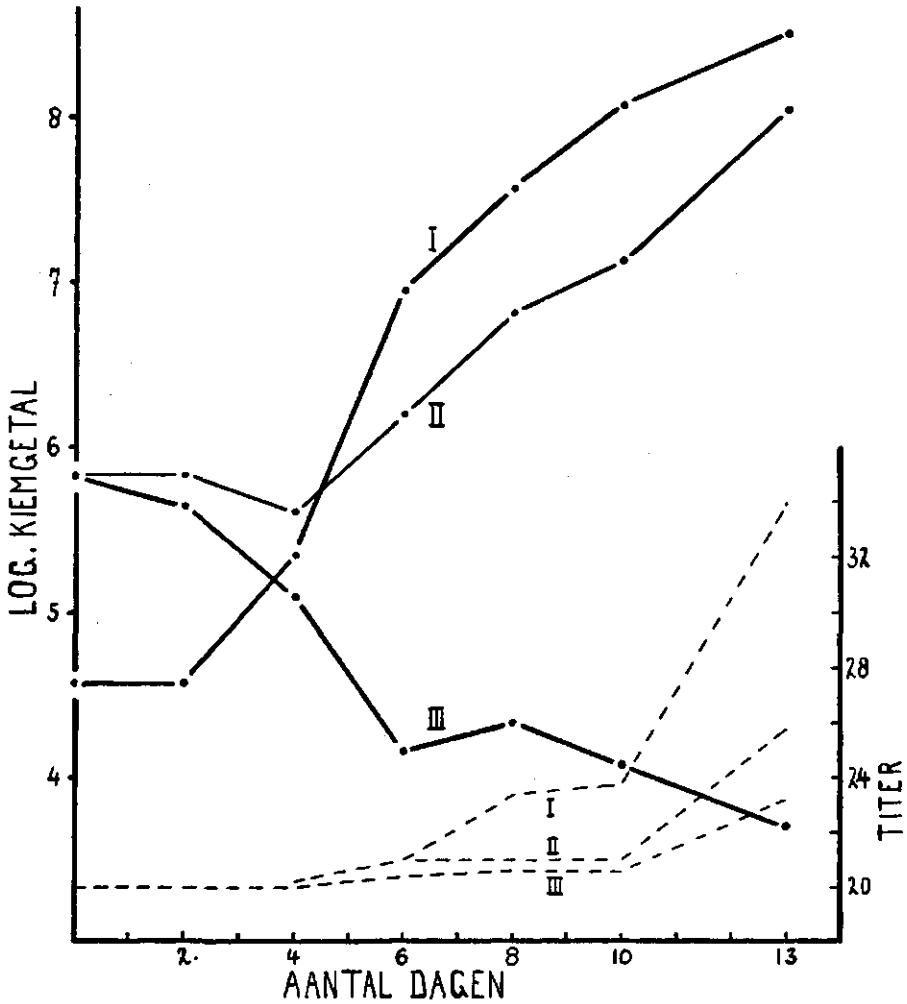


Fig. 13

- I. Rauwe melk onder gewone omstandigheden bewaard bij 4°—5° C.
 II. Rauwe melk onder 10 atm. stikstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.
 III. Rauwe melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.
 ————— = kiemgetal - - - - - = titer

De uit de beide tanks direct na de vulling met melk en gas afgetapte melk vertoont een hooger bacteriecijfer dan de verse controlemelk, hetgeen, zooals wij vroeger zagen, veroorzaakt wordt door het uiteenvallen

van bacterie-aggregaten bij het stroomen door de nauwe kraanopening onder hoogen druk. Daar beide tanks onder denzelfden druk stonden is bij beide melkmonsters de stijging van het bacteriegehalte dezelfde, onafhankelijk van den aard van het gas.

Het verloop van het kiemgetal is bij de contrôlemelk en de melk onder stikstofdruk weinig verschillend. De bacteriegroei is in de stikstofmelk iets langzamer, doch dit moet toegeschreven worden aan een secundaire oorzaak. Wij kunnen den toestand in de stikstoftank n.l. als anaerob beschouwen. De contrôlemelk stond aan de lucht en verkeerde dus, althans wat de oppervlaktelaag betreft, onder aerobe omstandigheden. Dit verschil in omstandigheden is van invloed op de zich ontwikkelende bacterieflora, die dus in beide gevallen niet precies dezelfde kon zijn. De toestand in de stikstoftank is b.v. gunstiger voor den groei van coliachtige bacteriën dan die in de contrôlemelk. Bij onderzoek volgens de methode Mc CONKEY (zie tabel 21) kon dan ook inderdaad in de stikstofmelk een grooter aantal coliachtige bacteriën gevonden worden.

De melk onder den zuurstofdruk vertoonde het reeds beschreven verschijnsel van de sterke daling van het bacterie-aantal in wat wij de *eerste phase* noemden.

Geur en smaak der contrôlemelk waren nog normaal na 6 dagen; na 8 dagen en later had zij een esterachtigen, bedorven geur. De stikstofmelk had na 8 dagen een nog vrijwel normalen geur en smaak en na 10 dagen was zij esterachtig en bedorven van geur. De zuurstofmelk was bij het afbreken der proef na 17 dagen nog goed, slechts was zij iets flauw, zoet en zwak naar diacetyl geurend, doch deze van weinig beteekenis zijnde geringe afwijking komt bij onder zuurstofdruk bewaarde melk bijna altijd voor.

De flora bestond na 13 dagen bij de contrôlemelk bijna uitsluitend uit vervloeiende bacteriën, bij de stikstofmelk hoofdzakelijk uit coliachtigen en vervloeienden en bij de zuurstofmelk uit een mengsel van melkzuurbacteriën en vervloeienden.

Uit deze proef blijkt dus zeer duidelijk, dat de conserveerende werking inderdaad aan *zuurstof* moet worden toegeschreven.

3. Kritische druk en temperatuur

Bij eerder genomen proeven werd gevonden, dat de groei der voor zuurstof weinig gevoelige melkzuurbacteriën sterker is naarmate de zuurstofdruk lager en de bewaartemperatuur hooger is. Bij deze vroeger uitgevoerde proeven werd onder verschillende omstandigheden bij verschillende monsters melk of room een maximum kiemgetal na de *2e phase* waargenomen als in tabel 22 vermeld.

TABEL 22

Vloeistof	Temperatuur	Zuurstof- overdruk	Bacteriemaximum
Melk	4°—5° C	2 atm.	48 000 000
„	4°—5° C	3,5 atm.	18 400 000
„	4°—5° C	5 atm.	18 000 000
„	4°—5° C	8 atm.	740 000
„	4°—5° C	9 — 9½ atm.	355 000
Room	4°—5° C	9½—10 atm.	496 000
Melk	4°—5° C	10½ atm.	450 000
„	4°—5° C	11 atm.	0
Room	4°—5° C	11 atm.	0
Melk	10° C	11 atm.	6 600 000
„	19° C	11 atm.	248 000 000

De kritische zuurstofoverdruk, boven welke geen groei der zuurstofflora meer kan optreden, zal dus hooger zijn naarmate de bewaartemperatuur hooger is. Uit de cijfers zou men geneigd zijn te concluderen, dat deze kritische druk bij een temperatuur van 4°—5° C bij 11 atmosfeer zuurstofoverdruk ligt. Doch uit de opgegeven getallen kan men zien, dat er onregelmatigheden voorkomen in de maximumkiemgetallen, die doen veronderstellen, dat de gevallen niet alle met elkaar vergelijkbaar zijn. Dit kan b.v. zijn oorzaak vinden in de temperatuur die onder de omstandigheden, waaronder wij de proeven uitvoerden, niet volkomen constant was, zoodat de gemiddelde temperaturen van verschillende proeven wel een halven graad konden verschillen. Ook kunnen verschillen ontstaan zijn door verschil in gevoeligheid der „zuurstofduplococci”. Uit tabel 22 toch blijkt duidelijk, dat deze bacteriën zuurstof goed verdragen kunnen, maar bij hoogen druk worden zij toch ook nadeelig door het gas beïnvloed. Ongetwijfeld is het aantal zuurstofduplococci in versche melk zeer gering. Uit de vele groeicurven die wij bepaalden, kan afgeleid worden, dat versche melk waarschijnlijk slechts 10 à 1000 van deze bacteriën per liter bevat. Bij een dergelijk gering aantal kunnen verschillen in de gevoeligheid voor zuurstof groote verschillen in den groei dezer bacteriën veroorzaken.

Bij een proef van 3 November 1937 bleek dan ook, dat in de melk, bewaard bij 4°—5° C onder een zuurstofoverdruk van 12 atmosfeer, de groei der zuurstofflora wel optrad. Deze proef werd uitgevoerd in roestvrij

stalen tanks en er werd vergeleken het verloop der bacterieflora bij 10 atm. en bij 12 atm. zuurstofoverdruk. Tabel 23 en figuur 14 geven het overzicht van deze proef.

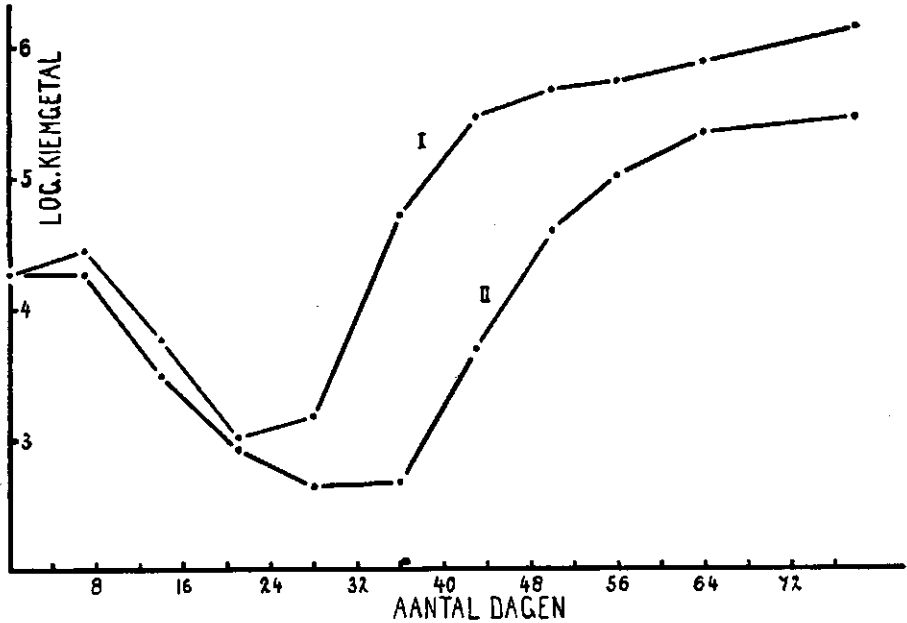


Fig. 14

- I. Rauwe melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.
 II. Rauwe melk onder 12 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.

Bij een overdruk van 12 atmosferen is dus nog een maximum van ongeveer 300 000 bacteriën per ml bereikt, zij het na langen tijd. Terwijl bij 10 atm. het minimum gewoonlijk na 20 à 24 dagen bereikt wordt, begon in de tank met 12 atm. de groei der zuurstofflora pas na 36 dagen merkbaar te worden, zoodat de ontwikkeling dezer bacteriën wel zeer langzaam geschiedde.

In overeenstemming met het feit dat bij 12 atm. nog duidelijke groei optrad, werd bij 10 atm. een hooger maximum gevonden dan meestal het geval is. In beide tanks was de flora dezelfde. Verschil in geur en smaak was niet te constateeren. Beide monsters melk waren na 64 dagen flauw en zoetig van smaak en na 78 dagen bovendien een weinigje vetzig.

Deze proef ter vergelijking van een bewaring bij 10 en bij 12 atm. zuurstofoverdruk is op 8 Februari 1938 herhaald. Ook nu was de tempera-

TABEL 23

Melk bij 4°—5° C bewaard bij 10 en 12 atm. zuurstofoverdruk

	10 atmosferen			12 atmosferen		
	Kiemgetal	Aantal coli-achtigen	Titer	Kiemgetal	Aantal coli-achtigen	Titer
Bij vulling	18 700	2,5	18,6	18 700	2,5	18,6
Na 7 dagen	23 300	9,5	19,2	18 200	0	18,8
„ 14 „	5 900	0,7	19,2	3 100	0	18,8
„ 21 „	1 040	0,4	19,2	850	0	18,6
„ 28 „	1 540	0,4	19,2	450	0	19,0
„ 36 „	51 300	0,4	19,6	480		19,6
„ 43 „	291 000	0	19,8	5 000	0	19,8
„ 50 „	458 000	0	19,8	39 000	0	19,6
„ 56 „	538 000	0	20,4	104 000		20,0
„ 64 „	764 000	0	20,4	222 000		20,0
„ 78 „	1 440 000	0	22,0	296 000	0	20,0

tuur 4°—5° C. Het resultaat van deze proef is vermeld in tabel 24 en grafisch voorgesteld in figuur 15.

TABEL 24

Melk bewaard bij 4°—5° C en 10 resp. 12 atm. zuurstofoverdruk

	10 atmosferen		12 atmosferen	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Bij vulling	23 500	16,8	23 500	16,8
Na 1 dag	80 000			
„ 2 dagen			51 000	
„ 7 „	5 400		5 300	
„ 15 „	700		700	
„ 22 „	300		310	
„ 31 „	200	17,4	220	17,4
„ 41 „	580		130	
„ 50 „	9 200		150	
„ 57 „	55 000	17,4	240	17,4
„ 73 „	140 000	17,4	6 000	17,4

Ook in deze proefneming is dus bij 12 atm. nog groei opgetreden. Uit de tabel blijkt evenwel hoe aarzelend de groei bij dezen hoogen druk begon. Een merkbare ontwikkeling van de zuurstofduplococcen werd pas na den 57sten dag geconstateerd.

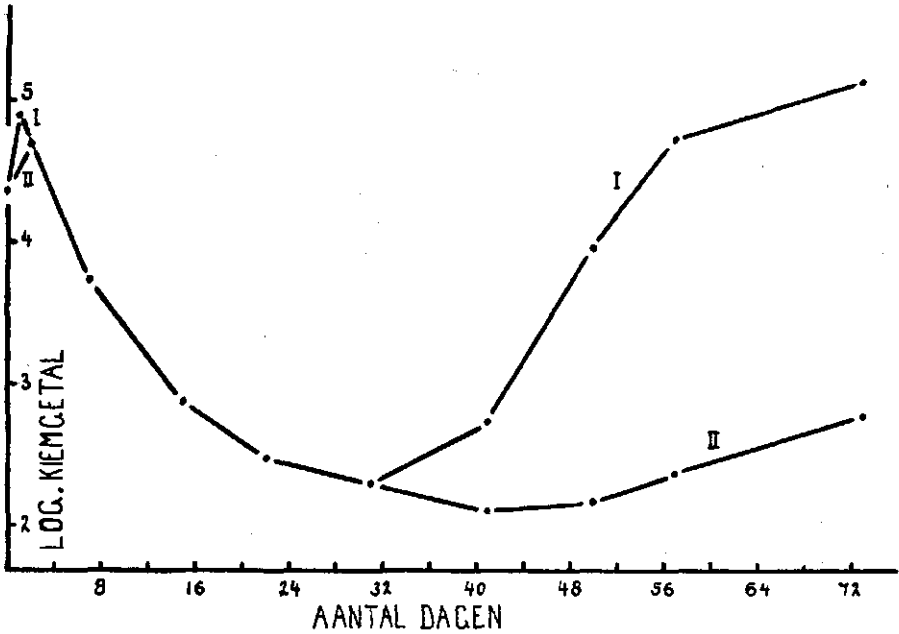


Fig. 15

- I. Rauwe melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.
 II. Rauwe melk onder 12 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 4°—5° C.

Geur en smaak van de melk in de tank met 10 atmosferen waren na 73 dagen flauw en zoet; de melk in de tank met 12 atmosferen was eenigszins onaangenaam. Zooals wij in onze vorige verhandeling hebben opgemerkt zien wij ook bij deze proef hoe de groei der zuurstofduplococcen de organoleptische eigenschappen van de melk niet slechter maakte, doch dat zij integendeel de nadeelige werking der zuurstof op de melk neutraliseerde.

Uit de verrichte proeven blijkt dus wel, dat de kritische zuurstofdruk, boven welke bij 4°—5° C geen groei der zuurstofduplococcen meer optreedt, niet precies te bepalen is, doch wel omstreeks 11—13 atmosfeer zuurstofoverdruk zal zijn. De door ons gebruikte tanks lieten proeven bij hoogerem druk niet toe.

Daar ook de temperatuur van invloed is op den aard van den groei der tweede phase kan verwacht worden, dat bij lagere temperatuur dan 4° C een lagere druk voldoende is om de ontwikkeling der zuurstofflora te verhinderen.

Bij een temperatuur van 1° C werden 3 proeven gedaan. Bij de eerste proef, begonnen op 8 Februari 1938 werd rauwe, versche, volle melk in een vertind koperen tank bewaard onder een zuurstofoverdruk van 10 atmosferen.

De tweede proef, aangevangen op 12 Juli 1938, werd genomen met een zuurstofoverdruk van 4 atmosferen. Hiervoor werd gebruikt versche, rauwe, volle melk in een vertind koperen tank.

TABEL 25

Bewaring van melk en room onder zuurstofoverdruk bij 1° C

Aantal dagen	Proef met melk van 8—2 '38				Melk van 12—7 1938 4 atmosferen		Room van 3—9 1938 11 atmosferen	
	Contrôlemelk		10 atmosferen		Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer				
0	23 500	16,8	23 500	16,8	27 000	16,6	447 000	15,4
2	20 300	—	32 000	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	78 700	17,0	—	—
7	26 000	16,8	3 600	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	7 100	17,2	—	—
15	41 000 000	18,4	800	—	—	—	23 000	17,8
17	—	—	—	—	1 090	17,2	—	—
24	122 000 000	24,2	500	—	148	17,4	—	—
26	—	—	—	—	—	—	2 500	19,2
30	—	—	—	—	458	17,6	—	—
36	—	—	—	—	3 500	—	—	—
41	—	—	300	—	—	—	130	19,2
43	—	—	—	—	32 100	18,0	—	—
50	—	—	130	—	490 000	18,0	—	—
53	—	—	—	—	—	—	30	19,6
57	—	—	140	16,4	—	—	—	—
62	—	—	—	—	1 670 000	18,2	—	—
73	—	—	120	16,4	—	—	—	—
91	—	—	160	16,8	—	—	—	—

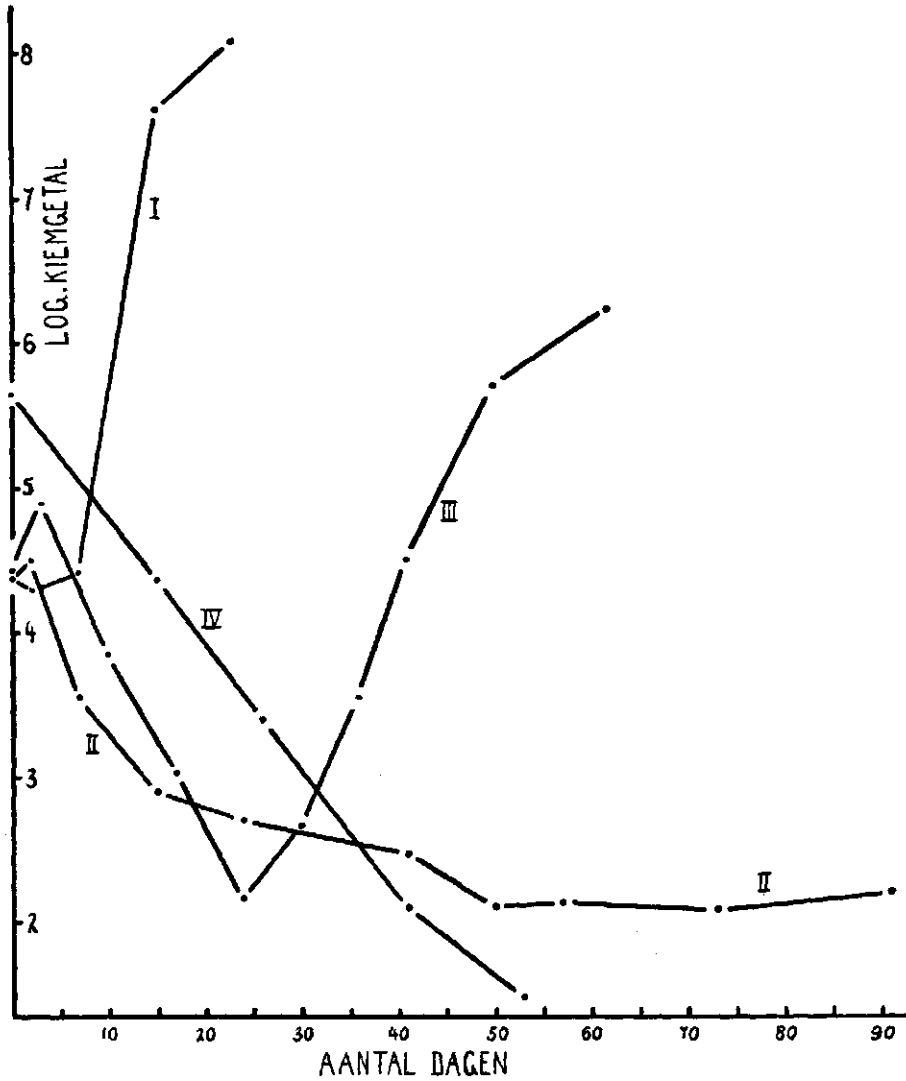


Fig. 16

- I. Rauwe melk van 8 Febr. 1938 onder gewone omstandigheden bewaard bij 1° C.
- II. Rauwe melk van 8 Febr. 1938 onder 10 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 1° C.
- III. Rauwe melk van 12 Juli 1938 onder 4 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 1° C.
- IV. Rauwe room van 3 Sept. 1938 onder 11 atm. zuurstofoverdruk bewaard bij 1° C.

De derde proef werd genomen met room in een roestvrij stalen tank bij een zuurstofoverdruk van 11 atm. Deze proef was in hoofdzaak bedoeld om den invloed van bewaring onder zuurstofdruk bij zeer lage temperatuur op geur en smaak te bepalen; zij werd begonnen op 3 September 1938.

Ter vergelijking werd bij de proef van 8 Februari ook melk bij 1° C geplaatst zonder zuurstofdruk in een geëmailleerd vat met los deksel.

De 4 bepalingssreeksen zijn in overzicht gebracht in tabel 25 en in figuur 16.

Het blijkt dus, dat inderdaad bij de gebruikte lage temperatuur de kritische zuurstofoverdruk beneden 10 atmosferen ligt. Hoewel met de ter beschikking staande tanks dus de kritische zuurstofoverdruk, waarboven geen en waarbeneden wel groei der zuurstofduplicococceen optreedt, bepaald kon worden is deze bepaling niet uitgevoerd. Zij zou toch alleen zin hebben als de bedoelde kritische druk zóó laag zou blijken te zijn, dat men kon volstaan met een veel lageren zuurstofdruk. Wij zien echter, dat bij 4 atm. overdruk nog een zeer sterke groei optreedt, zoodat een merkbaar lagere druk dan 10 atmosferen niet in staat is om bij 1° C den groei der zuurstofduplicococceen tegen te gaan.

Om nog een andere reden kon het belang van proefnemingen bij 1° C niet groot geacht worden. Wij merkten op, dat bij 4° C de bewaring onder zuurstofdruk aan de melk en den room een geringe afwijking in geur en smaak geeft en dat deze afwijking grooter is als geen groei der zuurstofduplicococceen optreedt dan wanneer een matige groei van deze microorganismen, tot b.v. hoogstens 1 millioen per ml, plaats vindt. Bij de proeven, welke wij bij 1° C namen, is echter steeds een sterkere ontwikkeling van geur- en smaakafwijkingen geconstateerd dan bij 4° C. Bij de melk werd iets bitter, iets sterk; bij den room iets bitter, iets cocos, iets boterzuur waargenomen.

4. Invloed van het bacteriegehalte van de versche melk

Bij de proeven, welke met melk genomen werden, is steeds gebruik gemaakt van versche melk, welke 's morgens gewonnen werd en om 8½ uur gekoeld werd tot de voor de proeven vereischte temperatuur. Over het algemeen was de melk van goede kwaliteit. Het kiemgetal der gekoelde melk was gewoonlijk lager dan 30 000, één keer bedroeg het aantal bacteriën per ml 65 000 en één keer 96 800.

Het leek ons gewenscht te bestudeeren hoe melk van slechtere bacteriologische kwaliteit zich bij de conserveering met zuurstof gedraagt. Daar onder den hoogen zuurstofdruk slechts een enkele bacteriesoort tot vermeerdering in staat is en de andere blijkbaar afsterven, zou verwacht kunnen worden, dat het aantal bacteriën, in de melk aanwezig op het oogenblik van het aanbrenge van den zuurstofdruk van weinig belang is, vooral daar wij gezien hadden dat het maximum aantal zuurstofduplicococceen aan

het einde der groei- (2de) periode alleen van den zuurstofdruk (en de temperatuur) afhangt. Mogelijk was evenwel een nadeelige beïnvloeding van geur en smaak door het in den aanvang aanwezige groote aantal bacteriën.

Er zijn proeven genomen met melk, welke op 2 manieren een hoog bacterie-aantal gekregen had. Bij het eene onderzoek werd versche melk van 24 Mei 1938 gedurende 24 uur in het laboratorium bij 20° C bewaard vóór zij tot 4° C afgekoeld en onder zuurstofdruk gebracht werd. Als vergelijking werd een portie van dezelfde melk in verschen toestand gekoeld en onder zuurstofdruk gebracht. Voor beide porties melk werd een roestvrij stalen tank gebruikt. De tanks werden bewaard bij 4°—5° C en de zuurstofoverdruk bedroeg 10 atmosfeer. Na verschillende dagen werden bepalingen verricht. Van het bacterie-aantal geven tabel 26 en figuur 17 (de lijnen I en II) een overzicht. Het aantal dagen, genoemd in de linker kolom van deze tabel geeft aan hoeveel dagen na den dag van melken de monsterneming geschiedde. Deze getallen geven dus aan hoe lang de „versche melk” in de tank was. De „1 dag oude melk” was dus steeds 1 dag korter in de tank.

Niettegenstaande het hooge aantal bacteriën in den aanvang is de proef

TABEL 26

Vergelijking van versche melk met melk, welke 1 dag bij 20° C bewaard is

	Versche melk			1 dag oude melk		
	Kiemgetal	Coli per ml	Titer	Kiemgetal	Coli per ml	Titer
Versche melk	12 800	1,0	17,0	12 800	1,0	17,0
Bij vullen der tank	12 800	1,0	17,0	5 100 000	9500	18,0
Na zuurstofvulling	222 000	4,5		13 400 000		
Na 3 dagen	49 000	4,5		10 000 000	2500	
„ 7 „	8 900	2,5		1 830 000		
„ 11 „	3 450			1 060 000	950	18,0
„ 14 „	3 180	0,9		576 000		
„ 17 „	1 560	0,4	17,0	625 000	450	18,0
„ 21 „	610	0		402 000	450	
„ 25 „	420	0		217 000	250	
„ 30 „	2 730		18,0	630 000		19,6
„ 34 „	12 500			1 280 000		20,0
„ 39 „	59 000	0	18,4	1 980 000	15	
„ 48 „	811 000		18,6	2 290 000	2,5	
„ 56 „	740 000		18,8	4 350 000	2,5	21,0
„ 65 „	810 000		19,0	5 440 000		22,0
„ 72 „	600 000			2 480 000	0,4	23,0
„ 78 „	204 000		19,0	1 900 000	0	23,0
„ 92 „	62 300		19,2			

met de 1 dag oude melk in kwalitatief opzicht op dezelfde wijze verlopen als met verse melk. Weer werd de daling van het bacterie-aantal gevolgd door een groeiperiode. Doch in vergelijking met kiemarme melk liggen de afstervings- en ook de groeilijn op hooger niveau. Waarschijnlijk beteekent dit, dat de bacteriën, die in de tweede phase groeien, zich vermeerderd hadden tijdens het gedurende 1 dag bewaren bij 20° C. Het bereikte „plafond” is in de bacterierijke melk hooger dan in de kiemarme melk. Dit hogere plafond kan niet verklaard worden door een langzamer afsterven van de oorspronkelijke flora. Terwijl als gewoonlijk na de 2de phase de flora van de oorspronkelijk kiemarme melk uit een reïncultuur van zuurstofduplococcon bestond, was de flora van de oorspronkelijk bacterierijke melk complexer na de 2de phase. In deze melk werden n.l. wederom dezelfde bacteriën (ook uit de groep der melkzuurbacteriën) gevonden, die vroeger ook in tanks met lagere zuurstof-overdrukken dan 9 atm. werden aangetroffen. Het grootere bacterie-aantal in het begin heeft dus een zelfden invloed als een lagere zuurstofdruk gehad. Overigens werden bij deze proef geen karakteristieke verschillen in de bacterieele flora of in het verloop der flora waargenomen. In beide tanks zijn de coli-achtige bacteriën door de gecombineerde werking van lage temperatuur en zuurstofdruk gedood, zij het dat dit in de tank met 1 dag oude melk langer duurde, omdat het beginaantal veel hooger was. De monsters melk, welke op verschillende dagen uit de tanks getapt waren, werden bij 21° C bewaard om te kunnen bepalen hoeveel tijd de in die monsters aanwezige melkzuurbacteriën noodig hadden om door hun zurende werking de melk te coaguleeren. Deze tijd bedroeg bij de verse melk 2 dagen en bij de 1 dag oude melk 1 dag. Bij beide nam deze tijd toe naarmate de melk langer in de tanks geweest was. Doordat als gevolg van het gedurende 1 dag bewaren bij 20° C onder gewone omstandigheden het aantal goed zurende melkzuurbacteriën in deze melk in het begin zeer groot was en ook tijdens het afstervingsproces van deze bacteriën grooter bleef dan in de andere tank, coaguleerde in de eerste maand van het bewaren deze melk bij 21° C sneller dan de melk, welke in verschen toestand in de tank gebracht was. In de 2de maand van bewaring was dit verschil onduidelijker en in de 3de maand was het verdwenen.

Het bewaren van de melk gedurende 1 dag bij 20° C vóór zij in de tank gebracht werd heeft wel eenigen invloed gehad op den geur en de smaak der tankmelk. De in verschen toestand in de tank gebrachte melk vertoonde gedurende den geheelen bewaartijd de gewone afwijking, n.l. flauwe geur en smaak, terwijl zij langzamerhand steeds iets zoeter van

smaak werd. De 1 dag bij 20° C bewaarde melk had bij het vullen der tank nog een normalen geur en smaak, na 2 dagen verblijf in de tank evenwel had zij een aan diacetyl herinnerenden geur en smaak, welke gedurende de geheele bewaarperiode van 3 maanden aanwezig bleef, doch eerder minder dan sterker werd. Hoewel deze melk dus een geur- en een smaakgebrek had, was toch de aard hiervan zoodanig, dat men moeilijk van bedorven melk kan spreken.

Bij de tweede proef werd vergeleken melk, welke in verschen toestand in de tank werd gebracht met melk, welke eenigen tijd bij lage temperatuur bewaard was vóór zij onder zuurstofdruk werd gebracht. Op 22 November 1938 werd 70 l versche gemengde volle morgenmelk gekoeld tot 3° C. 35 l hiervan werden in een vertind koperen tank gebracht en op de gewone wijze onder 10 atm. zuurstofoverdruk gezet. De overgebleven 35 l werden

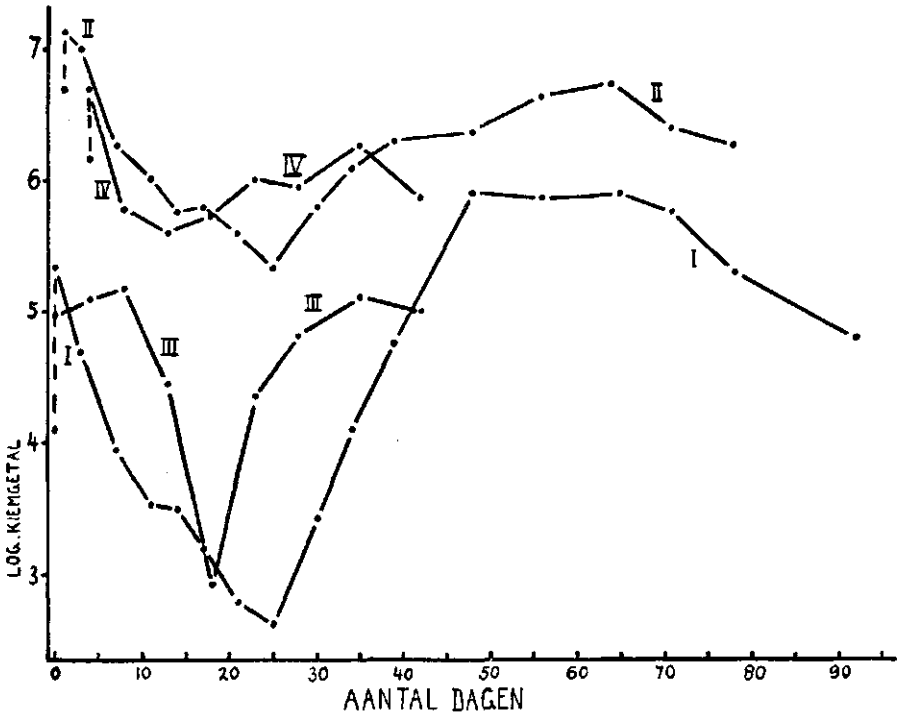


Fig. 17

- I. Rauwe melk in verschen toestand onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebracht.
 - II. Dezelfde melk na 1 dag bewaren bij 20° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebracht.
 - III. Rauwe melk in verschen toestand onder 10 atm. zuurstof overdruk gebracht.
 - IV. Dezelfde melk na 4 dagen bewaren bij 4° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebracht.
- De tanks werden bewaard bij 4°—5° C.

in een bus met deksel bij 4° C geplaatst en na 4 dagen in een vertind koperen tank gebracht onder een zuurstofoverdruk van eveneens 10 atm. Beide tanks werden bewaard bij ongeveer 4½° C. Als gewoonlijk werd alle dagen geschud en na iedere monsterneming de zuurstofoverdruk hersteld.

De gegevens over het aantal bacteriën en den titer zijn vermeld in tabel 27 en grafisch voorgesteld door de lijnen III en IV van figuur 17. Bij het aantal dagen, in tabel en grafiek aangegeven, moet men bedenken, dat deze gerekend zijn van den dag van het melken af. De „4 dagen oude melk” was dus steeds 4 dagen korter in de tank.

Beschouwen wij alleen de veranderingen in het aantal bacteriën dan zien wij geen groot verschil of de melk 1 dag bij 20° C of 4 dagen bij 4° C bewaard werd vóór zij onder den zuurstofdruk gebracht werd (vgl. de lijnen II en IV). Ook in de tank met 4 dagen oude melk werd de flora, welke op het moment van het vullen der tank aanwezig was, langzaam vernietigd om weer als gewoonlijk plaats te maken voor de flora van voor zuurstof weinig gevoelige duplococcen. Wel was de beginflora in de 4 dagen bij 4° C bewaarde melk geheel anders dan die in de 1 dag bij 20° C bewaarde melk. In de laatste bestond deze flora uit melkzuurbacteriën en coli, in de eerste uit vervloeiende bacteriën met daarnaast coli-achtigen en gisten. Pas na 28 dagen waren deze micro-organismen

TABEL 27

Vergelijking van versche melk met melk, welke 4 dagen bij 4° C bewaard is

	Versche melk		4 dagen oude melk	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
Versche melk	96 800	19,2	96 800	19,2
Vóór het vullen der tank.	96 800		1 480 000	
Na zuurstofvulling			5 050 000	
Na 4 dagen	127 000			
„ 8 „	151 000		614 000	
„ 13 „	28 400	19,0	397 000	19,8
„ 18 „	8 700		550 000	
„ 23 „	22 800		1 015 000	
„ 28 „	66 700	19,0	900 000	19,8
„ 35 „	132 000		1 850 000	
„ 42 „	100 000	19,0	750 000	20,8

nauwelijks meer tusschen de zuurstofduplococcen aanwezig. Hoewel na het vullen van de tank met de 4 dagen bij 4° C bewaarde melk de bacteriën der op dat tijdstip aanwezige flora langzamerhand vernietigd werden, hebben deze bacteriën toch een zeer nadeeligen invloed op geur

en smaak gehad. Toen de tank gevuld werd had de melk nog normalen geur en smaak, doch reeds bij de monsterneming na 4 dagen (8 dagen in de tabel) waren geur en smaak onfrisch. Er ontstond langzamerhand een geur die aan gras of rauwe groente, ook wel aan schimmelig stroo deed denken, welke geur steeds sterker en onaangener werd, zoodat de melk reeds na verblijf van 19 dagen in de tank ongenietbaar was. De controlemelk van deze proef, welke dus in verschen toestand in de tank gebracht was, had den gewonen flauwen, zoeten smaak en waarschijnlijk als gevolg van het hooge bacterie-aantal in de versche melk een zwakken diacetylgeur.

Uit deze proeven moge volgen, dat het de voorkeur verdient om voor de bewaring van melk onder zuurstofdruk melk te bezigen van goede hoedanigheid en dat vooral de aanwezigheid van veel vervloeiende bacteriën een nadeeligen invloed heeft op geur en smaak der tankmelk.

In het vorige artikel is een proef beschreven, waarbij boter bereid werd uit o.a. rauwen room, welke ongeveer 2 maanden bij 4°—5° C onder 11 atm. zuurstofoverdruk bewaard was. De kwaliteit van deze boter was minder goed. Dit was in overeenstemming met de ervaring, dat, bij bewaring onder zuurstofdruk bij lage temperatuur, room eerder tot smaak- en geurafwijkingen neigt dan melk. Bovendien was in dezen room de groei der tweede phase niet opgetreden, hetgeen ook een geringen nadeeligen invloed op reuk en smaak heeft. Het was ons namelijk gebleken, dat in melk de groei der zuurstofduplococcon eenigermate de ontwikkeling van reuk- en smaakgebreken kan tegengaan.

Wij hebben nu getracht na te gaan of mogelijk de slechte invloed, welke een hoog bacteriegehalte van den verschen room heeft, verminderd kan worden door den groei der zuurstofduplococcon met opzet toe te laten.

Voor deze proef, welke op 3 September 1938 begonnen werd, werd room gebruikt (vetgehalte ongeveer 20 %) met een bacterie-aantal van ongeveer 500 000 per ml. De eene helft werd bewaard bij 4°—5° C onder een zuurstofoverdruk van 8 à 8,5 atm., de andere helft bij 1° C onder een zuurstofoverdruk van 11 atm. Voor beide werd een roestvrij stalen tank gebruikt.

De room van 4°—5° C had na 14 dagen 58 000, na 26 dagen 960 000, na 40 dagen 3 445 000 en na 60 dagen 4 700 000 bacteriën per ml.

Na 26 dagen bestond de flora reeds geheel uit zuurstofduplococcon. Geur en smaak waren toen reeds iets afwijkend. Na 60 dagen was de geur iets diacetylachtig (als gevolg van het groote aantal zuurstofduplococcon), iets boterzuurachtig, iets onaangenaam en de smaak wrang, bitter, iets boterzuurachtig.

De bij 1° C bewaarde room bevatte na 53 dagen slechts 30 bacteriën per ml. Na 26 dagen was de geur iets afwijkend, na 53 dagen was de smaak wrang, bitter, iets boterzuurachtig.

Van beide porties werd resp. na 60 en 53 dagen op verschillende wijzen boter gemaakt, n.l.:

- A. Rauw, niet gezuurd.
- B. Gepasteuriseerd, niet gezuurd.
- C. Rauw, gezuurd.
- D. Gepasteuriseerd, gezuurd.

Uit het overzicht in tabel 28 volgt, dat alle botermonsters, die bij een temperatuur van 16°—17° C bewaard werden, van afwijkende kwaliteit waren; de boter van bij 1° C bewaarden room is nog iets slechter dan die van de bij 4°—5° C bewaarden room.

TABEL 28

Smaak van boter, bereid uit onder zuurstofdruk bewaarden room

	A	B	C	D
Room, bewaard bij 1° C en 11 atm. zuurstofoverdruk				
Versche boter	tamelijk goed iets bitter, iets wrang	tamelijk goed iets wrang	tamelijk goed iets metalig	tamelijk goed iets scherp, iets wrang
Boter 7 dagen oud . . .	slecht bitter	matig iets wrang, iets bitter	tamelijk slecht bitter	matig iets wrang, iets bitter
Boter 16 dagen oud . . .	slecht	slecht olieachtig	tamelijk slecht iets wrang	matig iets wrang
Room, bewaard bij 4°—5° C en 8 à 8,5 atm. zuurstofoverdruk				
Versche boter	matig bitter, wrang	tamelijk goed iets wrang	tamelijk goed iets wrang	tamelijk goed iets bitter
Boter 9 dagen oud . . .	slecht bitter	matig	matig	tamelijk goed
Boter 17 dagen oud . . .	slecht bitter	tamelijk slecht	matig iets metalig	tamelijk goed iets wrang

Ook uit deze boterproef moge dus blijken, dat uit onder zuurstofdruk bewaarden room in het algemeen niet boter van goede kwaliteit kan worden gemaakt.

5. De bacteriën der zuurstofflora

Aan het einde gekomen van onze proeven met rauwe melk, willen wij nog enkele gegevens mededeelen over de bacteriën, die in de onder zuurstof-druk bewaarde rauwe melk groeiden en wier groei de tweede phase vormde in het bacterieel proces, dat in de tanks geschiedde.

Er is reeds vermeld dat zij tot de groep der melkzuurbacteriën behooren, doch zij vormen zoo weinig melkzuur, dat gesteriliseerde melk bij 21° C door hun zuurproductie pas na 12 of meer dagen coaguleert. Alle uit verschillende tanks gedurende de tweede (groei-) phase geïsoleerde bacteriën waren duplococcen, die soms in den vorm van streptococcen voorkwamen.

Het was de vraag of wij hier met het geslacht *Streptococcus* of *Betacoccus* te maken hadden en om deze vraag te beantwoorden is van een aantal cultures van deze bacteriën bepaald of zij in melk uit lactose links- of rechtsdraaiend melkzuur produceeren. Daar de toevoeging van een weinig gistautolysaat een verhoogde zuurproductie ten gevolge had, werd aan de melk een weinig van deze stof (10 ml onverdunde gistautolysaat per liter melk) toegevoegd. Gekweekt werd bij 30° C. Nadat de melk door zuurvorming gestremd was, werd 5 g krijt per liter toegevoegd en dagelijks geschud. 2 à 3 weken later werd het melkzuur uit de cultuur geïsoleerd en onderzocht door het kristalwatergehalte van het zinkzout, het ZnO-gehalte van het droge zinkzout en de draaiingsrichting van een oplossing van het zinkzout te bepalen. Het ZnO-gehalte van zuiver kristalwatervrij Zn-lactaat is 33,43 %; het kristalwatergehalte van optisch actief zinklastaat is 12,89 % en van optisch inactief zout 18,17 %. Zie tabel 29.

TABEL 29

Melkzuurmodificatie van zuurstofduplococcen

Stam	Datum	Verkregen zinklactaat		Draaiing zinkzout
		Watergehalte	ZnO-gehalte watervrij zout	
4	11 Februari '38	12,85 %	33,46 %	rechts
8	11 Februari '38	13,41 %	34,8 %	links
17	6 Mei '38	13,83 %	33,42 %	links
20	6 Mei '38	12,86 %	33,46 %	rechts
21	6 Mei '38	12,78 %	33,42 %	rechts

Van de onderzochte stammen maken dus n°. 4, 20 en 21 linksdraaiend melkzuur en n°. 8 en 17 rechtsdraaiend. N°. 4, 20 en 21 behooren dus tot het geslacht *Betacoccus*, n°. 8 en 17 tot het geslacht *Streptococcus*.

Vroeger is medegedeeld, dat bij 4° C en 10 atm. zuurstofoverdruk de bacteriënflora tijdens en na de tweede phase uit een reïncultuur van een bepaalde bacteriesoort bestaat. Stam n°. 4, 20 en 21 zijn uit een dergelijke flora geïsoleerd. Bij lagere zuurstofdruk of hogere temperatuur komen daarnaast ook bacteriën met grootere kolonievorm voor; n°. 8 en n°. 17 zijn hiervan vertegenwoordigers.

De het best zuurstof verdragende duplococceen zijn dus betacocceen. Daar een andere vertegenwoordiger der betacocceen, *Betacoccus cremoris*, het citroenzuur der melk ontleedt, hebben wij onderzocht of ook de zuurstofbetacocceen citroenzuur aantasten. Inderdaad is dit het geval, zooals tabel 30 leert.

TABEL 30

Citroenzuur in cultures in melk van zuurstofduplococceen

Stam	Onderzocht na	mg citroenzuur per liter	mg azijnzuur per liter
ongeënt	33 dagen	1930	
4	33 "	325	1233
5	33 "	204	1417
6	33 "	1069	
7	33 "	377	1233
ongeënt	32 "	1910	
8	32 "	1895	
17	32 "	1874	
20	32 "	0	
21	32 "	0	

Alleen de stammen 8 en 17 tasten het citroenzuur niet aan; deze zijn dan ook volgens tabel 29 *Streptococcus*-stammen. In tabel 30 is tevens voor een aantal der betacocceen de hoeveelheid geproduceerd azijnzuur opgegeven. Deze hoeveelheid is ongeveer gelijk aan die welke aroma-betacocceen (*Betacoccus cremoris*) in melk vormen. De combinatie van deze verschijnselen gaf ons aanleiding om te onderzoeken of er meer overeenkomst tusschen deze zuurstofduplococceen en *Bc. cremoris* bestaat. De laatstgenoemde soort vormt uit citroenzuur in zuur milieu (b.v. met melkzuur of andere zuren aangezuurde melk) behalve koolzuur en azijnzuur de z.g. „C₄-verbindingen”, diacetyl, acetylmethylcarbinol en butyleenglycol. In neutraal milieu (b.v. melk) worden deze C₄-verbindingen niet gevormd (2).

Het onderzoek werd gedaan met 3 stammen van zuurstofbetacocceen.

die geënt werden eenerzijds in centrifugemelk en anderzijds in centrifugemelk + 50 ml $\frac{n}{l}$ melkzuur per liter. De uitkomsten vermeldt tabel 31.

TABEL 31

Zuurstofbetacoccon geënt in melk en in melk + melkzuur op 16 Maart 1939

Stam	Vloeistof	Bepaald na	mg per liter				
			citroenzuur	azijszuur	acetyl-methyl-carbinol	butyleen glycol	C ₄ -prod.
4	melk + zuur	9 dagen	0	969	0	192	192
	melk	34 "	546	1032	0	20	20
20	melk + zuur	4 "	0	948	0	219	219
	melk	20 "	0	1157	0	30	30
21	melk + zuur	4 "	0	850	149,5	130	280
	melk	20 "	0	1171	0	20	20

Wij zien dus volkomen dezelfde verhoudingen der citroenzuurontleidingsproducten als bij aromabacteriën. Daarom hebben wij nagegaan of de zuurstofbetacoccon ook, evenals de aromabacteriën, aroma in melk vormen. Wij onderzoeken dat door de bacteriën te enten in centrifugemelk, waaraan per 30 ml 1,8 en 2,1 ml $\frac{n}{l}$ citroenzuur is toegevoegd en eenige keeren den geur te beoordeelen. 9 stammen zijn aldus onderzocht, doch bij geen enkele werd aromageur gevonden.

Het temperatuuroptimum der zuurstofbetacoccon ligt bij ongeveer 30° C. Het temperatuurminimum ligt zeer laag; zooals uit de proef van tabel 25 blijkt, was er bij 1° C nog een goede groei. De doodingstemperatuur, bepaald door een 10 minuten durende verhitting van met de bacteriën geënte melk in een dichtgesmolten buis, ondergedompeld in een waterbad, lag voor de *Betacoccus* stammen tusschen 50° en 60° C, voor de *Streptococcus* stammen tusschen 60° en 70° C.

6. Conserveering van gepasteuriseerde melk

De proeven met rauwe melk hebben alle het resultaat gegeven, dat bij een zuurstofoverdruk van 10 atmosferen en bij temperaturen van 4° tot 20° C alle in melk voorkomende bacteriën langzamer of sneller afsterven en de oorspronkelijke melkflora vervangen wordt door een van (zwak zurende) melkzuurbacteriën. Blijkbaar zijn deze laatstgenoemde bacteriën altijd, zij het in kleine aantallen, in melk aanwezig. Daar deze „zuurstofmelkzuurbacteriën” geen sporen vormen, zullen zij door pasteurie-

satie gedood worden en kunnen wij dus verwachten, dat bij het bewaren van gepasteuriseerde melk onder 10 atm. zuurstofoverdruk de groei der tweede phase niet optreedt. In gepasteuriseerde melk zal ook de eerste phase niet gevonden worden, omdat de bacteriën die in de 1ste phase vernietigd kunnen worden, reeds door de pasteurisatie gedood zijn. Het ligt dus voor de hand om te veronderstellen, dat bij het bewaren van gepasteuriseerde melk geen bacterieele veranderingen optreden of dat hoogstens de enkele bij de pasteurisatie overgebleven sporevormende bacteriën langzaam zullen sterven.

De interpretatie van onze met rauwe melk genomen proeven leidt dus vanzelf in de richting van het z.g. „procédé HOFIUS—RICHTER”. RICHTER pasteuriseerde de melk b.v. bij 55° C gedurende zeer langen tijd onder gelijktijdige toepassing van een zuurstofoverdruk van 10 atm. Of de toepassing van den zuurstofdruk tijdens de pasteurisatie essentieel is, volgt uit zijn „Gutachten” niet. Hij wenschte bij zoo laag mogelijke temperatuur te pasteuriseeren om zoo weinig mogelijk aan de melk te veranderen en het is denkbaar, dat bij pasteurisatie onder zuurstofdruk uit een oogpunt van bacterievernietiging met een iets lagere temperatuur kan worden volstaan dan bij pasteurisatie zonder zuurstofdruk. Hij vond dat voor bewaring onder 10 atm. zuurstofoverdruk bij 20°—25° C de pasteurisatie bij 55° C (eveneens onder 10 atm. zuurstofoverdruk) minstens 4 uren moest duren. Bij 63° C was dit 3 uur en bij 50° C was 8 uren nog niet voldoende. Over smaak en geur werd door hem in het „Gutachten” niets medegedeeld.

In het vorige artikel is reeds vermeld, dat MOHR en BAUR ook proeven gedaan hebben met gepasteuriseerde melk. Zij maakten geen bacteriologische analyses, doch bepaalden zich tot titer en smaak van de bewaarde melk. Zij pasteuriseerden 30 min. op 63° C en vonden, zoowel bij melk, die zonder als bij melk, die onder zuurstofdruk gepasteuriseerd was, een spoedig optreden van afwijkenden smaak bij bewaring onder 10 atm. zuurstofoverdruk en bij een temperatuur van 20° C. Bij bewaring onder zuurstofdruk bij 5° C bleef de smaak vrij goed, doch, evenals wij bij rauwen room vonden, bemerkten zij dat gepasteuriseerde room blijkbaar gevoeliger is, wat smaak betreft, dan gepasteuriseerde melk. Het belangrijkste smaakgebrek bleek te zijn „bitter”.

In het vorige artikel vermeldden wij reeds 2 proefnemingen met gepasteuriseerde melk en room, welke na de pasteurisatie bij 4°—5° C bewaard werden onder een zuurstofoverdruk van ongeveer 11 atmosfeer. Daar in de melk tijdens het bewaren bacteriegroei optrad en in den room

niet, terwijl in een tank met denzelfden room in rauwen toestand ook geen groei geconstateerd werd, kon uit deze proeven geen conclusie getrokken worden. Slechts bleek dat de smaak weinig afwijkend was, hetgeen bewijst, dat de bewaring van gepasteuriseerde melk of room bij lage temperatuur mogelijk is.

Bij de beschreven proef met melk (zie hoofdstuk 18 van dat artikel) was blijkbaar infectie opgetreden. De proef is daarom op 17 Maart 1938 overgedaan en op dezelfde wijze uitgevoerd. Een roestvrij stalen tank werd na zorgvuldig uitstoomen gevuld met verse rauwe volle melk en in een waterbad van 85°—90° C geplaatst. Onder voortdurend roeren werd de melk gedurende een half uur op 80°—85° C verhit en daarna afgekoeld door de tank in een bak met stroomend koud water te plaatsen. Nu werd de tank gesloten met een gesteriliseerde kop (deksel met aftap-inrichting) en met zuurstof gevuld tot 10 atm. overdruk. Na afblazen van deze zuurstof werd nogmaals met zuurstof tot 10 atm. overdruk gevuld.

De tank werd geplaatst bij 20° C en dagelijks geschud. Hoewel de pasteurisatie goed geslaagd was (aantal bacteriën slechts 44 per ml), bleek bij de monsterneming na 4 dagen de melk op dezelfde manier bedorven te zijn als rauwe melk onder deze omstandigheden. Er moest dus een infectie met niet-sporevormende bacteriën zijn opgetreden. De proef is daarop op andere wijze herhaald.

Op 24 Maart 1938 werd wederom een roestvrij stalen tank gevuld met 40 liter volle melk. De tank werd nu gesloten en geheel ondergedompeld in een waterbad dat door inblazen van stoom verwarmd werd. Nadat de temperatuur van het waterbad 91° C was, is de tank nog 40 minuten in het bad bij die temperatuur gebleven onder voortdurend schudden. Na afkoelen van de tank in stroomend water werd gevuld met zuurstof zoals hierboven beschreven. De melk werd bewaard bij 20° C en onder een zuurstofoverdruk van 10 atm. Af en toe werd een monster voor het onderzoek genomen (Tabel 32).

TABEL 32

Melk in tank gepasteuriseerd gedurende 40 min. bij 90° C en bewaard bij 20° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk

	Kiem- getal	Bacteriesoorten	Titer	Geur en smaak
Na 0 dagen	55	sporevormende	17,6	kokerig
" 6 "	50	vervloeiende	17,2	kokerig
" 14 "	42	vervloeiende	17,4	iets cocos, vetting
" 29 "	40	sporevormende	17,0	waligelijk

De bacteriologische uitkomsten dezer proef zijn geheel volgens de verwachting. Door het pasteuriseeren in een gesloten tank is thans iedere infectie vermeden en inderdaad blijft de bacteriologische kwaliteit van de melk uitstekend. De weinige bij de pasteurisatie overgebleven sporevormers hebben zich niet vermeerderd; hun aantal gaat zelfs, zij het langzaam, achteruit. Zeer teleurstellend zijn echter geur en smaak. In de eerste plaats is gebleken, dat de kookgeur, welke de melk door de pasteurisatie heeft gekregen, door de zuurstofbehandeling niet verdwenen is. Reeds na 14 dagen bewaren bij 20° C openbaart zich een smaak- en reukgebrek, dat na 29 dagen zóó sterk is toegenomen, dat de melk volkomen ongenietbaar geworden is.

Daar dit gebrek niet door bacteriën is veroorzaakt, moet het geweten worden aan den invloed van de zuurstof op de melk bij de hooge temperatuur van 20° C, want bij bewaren van gepasteuriseerde melk of room bij 4°—5° C werd dit gebrek niet waargenomen. Er zijn daarom proeven gedaan met toepassing van een lageren zuurstofdruk, n.l. een overdruk van 2, 4 en 5 atmosferen. Bij eerdere proeven bij 4°—5° C was n.l. gevonden, dat bij een zuurstofoverdruk van 3,5 atmosfeer de flora van zuurstofmelkzuurbacteriën in de tweede phase de overhand krijgt en ook bij 2 atmosferen de groeiende flora er een is van niet-sporevormende bacteriën. Daar de sporevormende bacteriën een hoogere temperatuur voor hun groei noodig hebben, is het dus mogelijk dat bij 20° C het zuurstofmaximum voor deze bacteriën hooger ligt. Wij hebben de zuurstofoverdrukken van 2, 4 en 5 atmosferen gekozen om eenig inzicht in de gevoeligheid van sporevormende bacteriën voor zuurstof te krijgen. De 3 proeven werden alle op dezelfde, hierboven beschreven wijze uitgevoerd en het resultaat van de proeven met 2 en 4 atm. is vermeld in tabel 33. Bij de proef met 5 atm. zuurstofoverdruk, begonnen op 3 Augustus 1938, is slechts één bepaling gedaan na 38 dagen bewaren. Het aantal bacteriën was toen 2800 per ml, de titer bedroeg 18,0; de melk rook zoet en iets vettig en was eenigszins onaangenaam van smaak.

In alle 3 tanks is dus groei opgetreden en wel sneller naarmate de druk der zuurstof lager was. Infectie is bij geen der 3 proeven opgetreden want de eindflora bestond slechts uit sporevormende bacteriën. Deze waren van één soort, zoodat de melk den indruk van een reincultuur maakte. Bij 4 atmosferen overdruk is de melk 30 dagen bacteriologisch goed gebleven, bij 5 atmosferen 38 dagen. Wij kunnen hieruit afleiden, dat een zuurstofoverdruk lager dan 10, doch hooger dan 5 atmosferen in staat zal zijn gepasteuriseerde melk voor bacterieel bederf te vrijwaren, doch een lagere druk dan 10 atm. zal niet de ontwikkeling van geur- en smaak-

gebreken verhinderen, want bij 4 atm. waren reeds na 7 dagen geringe aanwijzingen van een afwijkenden geur.

TABEL 33

Gepasteuriseerde melk, bewaard bij 20° C onder zuurstofdruk

Aantal dagen	2 atm. zuurstofoverdruk 21 Juni 1938			4 atm. zuurstofoverdruk 3 Mei 1938			
	Kiem- getal	Titer-	Reuk	Kiem- getal	Titer	Reuk	Smaak
0	3	17,0	kokerig	15	17,6	kokerig zoetig, iets co- cos	kokerig normaal
7				30	17,2		
15	420 000	29,8	bedorven	131	17,4	iets vetting sterk afwijkend iets sterk vettig	flauw, kokerig kokerig zoetig iets afwijkend iets cocos
21				30	17,2		
29				12	17,2		
43				18,0	18,0		
45				33 500	18,0		

De smaak- en reukgebreken bij deze proeven zijn dus niet door een bacterieelen oorzaak ontstaan. Om te bepalen of het metaal der tanks hierop van invloed was is melk in Erlenmeyerkolven door indompeling in een waterbad gepasteuriseerd. Daarna werden de glazen kolven in een gestel geklemd en dit gestel in een vertind koperen tank geplaatst, waarin daarna de lucht vervangen werd door zuurstof onder 10 atm. overdruk. Bewaard werd bij 20° C en alle dagen geschud. Tabel 34 geeft de bacteriologische resultaten.

TABEL 34

Gepasteuriseerde melk, in glazen kolven bij 20° C bewaard onder 10 atm. zuurstofoverdruk

Melk, gepasteuriseerd	Kiemgetal	
	na pasteuri- satie	na 42 dagen bewaren
10 min. op 80° C	164	13
20 min. op 80° C	23	11
30 min. op 80° C	27	16
30 min. op 65° C	14	8
60 min. op 65° C	16	31
120 min. op 65° C	10	9

Er heeft dus geen ontwikkeling van bacteriën plaats gehad. De geur was na 42 dagen bewaren voor de melk bij 80° C gepasteuriseerd cocos-

achtig en voor die bij 65° gepasteuriseerd zeepachtig. De smaak was resp. zeepachtig en bitter.

Het bewaren in glas heeft dus geen verbetering gebracht.

Daar de mogelijkheid bestond, dat een hoge pasteurisatietemperatuur een nadeeligen invloed op de gevoeligheid van de melk voor zuurstof heeft, is ook een proef gedaan met pasteurisatie bij 55° C. Deze proef is op dezelfde wijze uitgevoerd als bij het procédé HOFIUS—RICHTER. Een roestvrij stalen tank werd gevuld met verse melk, gesloten en met zuurstof gevuld tot 10 atm. overdruk. De tank werd nu door onderdompeling in een waterbad, dat met stoom op een temperatuur van 55°—57° C gehouden werd, gedurende 5 uren verhit. Daarna werd tot 20° C afgekoeld, een monster genomen en de druk met zuurstof tot 10 atm. overdruk hersteld en het geheel onder dagelijks schudden bij 20° C bewaard. De geur van het genomen monster was normaal, de smaak flauw. Het aantal bacteriën bedroeg 840 per ml. Deze bacteriën groeiden zóó langzaam in de agarplaten, dat pas na 3 dagen staan bij 29° C en daarna 10 dagen bij 20° C het aantal koloniën zijn maximum bereikt had. (Na 3 dagen bij 29° C was het aantal koloniën slechts 125 per ml.)

Na 51 dagen werd een monster onderzocht. De titer was onveranderd gebleven en de melk was ten naaste bij bacterievrij. De geur der melk was bij verwarming iets cocosachtig, flauw en zoet; bij koken flauw, zoet en iets zeepachtig. De smaak der melk was flauw, zoet, iets zeepachtig en adstringeerend.

Hoewel smaak en reuk dus eenigszins afwijkend waren, waren zij toch veel beter dan bij de op 80° C gepasteuriseerde melk.

Ten slotte is nog een proef gedaan met melk, welke bij 85° C gepasteuriseerd werd, doch thans in een stikstofatmosfeer. Na het vullen met melk en het sluiten der tank werd stikstof ingeblazen tot 5 atm. overdruk. Na afblazen werd weer tot 5 atm. overdruk met stikstof gevuld en dit werd nog één keer herhaald. Na pasteurisatie op 85° C in een waterbad gedurende ongeveer 40 minuten en afkoeling werd de stikstof vervangen door zuurstof tot 10 atm. overdruk. De tank werd bewaard bij 20° C. Een na deze pasteurisatie genomen monster der melk bevatte 11 bacteriën per ml.

Na 48 dagen bewaren was de titer onveranderd en het aantal bacteriën 7 per ml. Bij verwarmen had de melk kookgeur en een geringen cocosachtigen geur, bij koken was de geur iets zoet. De smaak was iets kokerig, iets zoet.

De bewaring van melk onder zuurstofdruk bij 20° C is dus alleen mogelijk met in de tank gepasteuriseerde melk. Pasteurisatie bij hoge temperatuur leidt echter tot het ontstaan van ernstige smaak- en reukgebreken. Langdurige pasteurisatie bij 55° C geeft een beter product, waaraan echter toch in geringe mate smaak- en geurafwijkingen ontstaan. Het beste resultaat kregen wij met pasteurisatie op 85° C in een stikstofatmosfeer.

7. Proeven met reïncultures van bacteriën

Bij den aanvang van het onderzoek was het onze bedoeling om na een oriënteerend onderzoek met rauwe melk proeven te doen met gesteriliseerde melk, waarin verschillende bacteriesoorten in reïncultuur geënt zouden worden om aldus van deze bacteriesoorten de gevoeligheid voor zuurstof te bepalen. Daar evenwel de met rauwe en gepasteuriseerde melk genomen proeven een zeer duidelijk resultaat gegeven hebben, achtten wij dit onderzoek niet noodzakelijk. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat resultaten, verkregen met reïncultures niet zoo maar toegepast mogen worden op rauwe of gepasteuriseerde melk, waarin zich concurrerende werkingen tusschen verschillende bacteriesoorten kunnen afspelen, die in reïncultures niet voorkomen.

Een uitzondering is slechts gemaakt voor coli-achtige bacteriën en melkzuurbacteriën. In ons eerste artikel zijn in hoofdstuk 15 de proeven met reïncultures van colibacteriën beschreven.

Wat de melkzuurbacteriën betreft was uit proeven met rauwe melk bij 20° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebleken, dat de gewone melkverzurende melkzuurbacteriën (*Sc. lactis*, *Sc. cremoris*) hierin niet tot ontwikkeling komen. De beïnvloeding van deze bacteriën door zuurstof is nader bestudeerd. Daarvoor werd gebruik gemaakt van kleine vertindkoperen tanks met een inhoud van ongeveer 3 liter.

Bij de eerste proef van 13 Juli 1938 werd 3 liter gesteriliseerde centrifugemelk geënt met 0,1 % van een zuursel en een andere portie van 3 liter met 0,1 % van een reïncultuur van *Sc. lactis* n°. 302. De melk werd in de tank gebracht en bewaard bij 20° C en 10 atm. zuurstofoverdruk. Zie tabel 35.

In beide proeven zijn de melkzuurbacteriën dus krachtig gegroeid. Het maximum is wel veel lager dan onder normale omstandigheden waarin het ongeveer 1 200 000 000 bedraagt. De zuurstof heeft dus wel invloed gehad.

Daar in deze proef de enthoeveelheid zeer groot was, is de proef op

TABEL 35

Melkzuurbacteriën onder 10 atm. zuurstofoverdruk bij 20° C

Na	Zuursel		Sc. lactis n°. 302	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
0 dagen	1 980 000	17,0	2 510 000	17,0
2 "	169 800 000	31,8	202 400 000	28,8
8 "	155 000 000	42,4	204 000 000	36,2
16 "	37 000 000	47,0	148 000 000	
23 "	12 000 000	47,0	15 000 000	
30 "	760 000	47,0	11 000 000	
37 "			5 800 000	37,8

29 Augustus en 24 October 1938 herhaald met geringere entingen. Daarnaast werd ook geënt in melk, welke 2 etmalen tevoren in de tank onder 10 atm. zuurstofoverdruk gebracht was om deze melk met zuurstof te verzadigen.

TABEL 36

Zuursel, geënt in melk, van te voren al of niet met zuurstof verzadigd

Aantal dagen	Melk verzadigd met zuurstof		Melk, niet verzadigd met zuurstof	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
0	81 000	15,6	121 000	16,2
1	405 000	15,8	146 000 000	23,2
3	147 000	17,0	181 000 000	28,2
5	24 000 000	29,2		
7	18 600 000	31,8	163 000 000	31,2
0	3 350	19,0	6 800	19,0
1	20 000	19,0	1 270 000	19,0
3	2 216 000	21,0	18 500 000	20,2
7		24,2	3 270 000	20,2
10	6 260 000	28,0	2 000 000	21,2
15	4 800 000	34,6		

Bij beide proeven is dus een duidelijke groei geconstateerd. Het maximum aantal bacteriën wordt sterk beïnvloed door de enthoeveelheid. Ook het feit, dat in van te voren met zuurstof verzadigde melk de groei niet zoo sterk is als in niet van te voren met zuurstof verzadigde melk, bewijst dat de melkzuurstreptococceen sterk door de zuurstof benadeeld worden.

Dat echter de uitkomsten van een proef met reïncultures niet zoo maar toegepast mogen worden op een toestand, waarbij meer bacteriesoorten aanwezig zijn, volgt uit een proef, waarbij gesteriliseerde melk

geënt werd eenerzijds met 0,0125 % van een cultuur van *Sc. lactis*, anderzijds met eenzelfde hoeveelheid van deze cultuur + 0,0125 % van een cultuur van een zuurstofduplococcus (stam 17). Deze stam was geïsoleerd uit bij 20° C onder zuurstofdruk bewaarde rauwe melk. De bewaar temperatuur was 20° C en de toegepaste zuurstofoverdruk bedroeg 10 atmosferen. (Zie tabel 37.)

TABEL 37

Gesteriliseerde melk, geënt met Sc. lactis en een mengcultuur van Sc. lactis en een zuurstofduplococcus

Aantal dagen	Sc. lactis		Mengcultuur	
	Kiemgetal	Titer	Kiemgetal	Titer
0	7 850	18,4	7 600	18,2
1	220 000	18,6	4 310 000	18,4
2	3 160 000	18,4	100 000 000	19,6
3	1 100 000	19,6	85 000 000	19,6
5	67 300	20,0		
7	54 000	20,0		

Bij de mengcultuur was na 2 dagen op de cultuurplaten geen enkele kolonie van de in de melk geënte *Sc. lactis* te vinden. De flora bestond geheel uit zuurstofduplococci, welke de *Sc. lactis* verdrongen hadden.

8. Vitamine A

Bij het onderzoek naar het Hofiusprocédé zijn de bacteriologische onderzoeken verricht door de Bacteriologische afdeling van het Rijkslandbouwproefstation (1), de onderzoeken over het gehalte aan vitamine A door de Physiologische afdeling (3). Daar bij het onderzoek door beide afdelingen werd gebruik gemaakt van hetzelfde materiaal, volgt hieronder een opgave, waaruit men kan aflezen op welke bacteriologische proeven het vitamine-onderzoek betrekking had.

N°. van de proef genoemd in tabel 1 van het artikel over vitamine A	Aanvangsdatum der proef	Tabel- en figuurnummer uit de 2 artikelen over de bacteriologische proefnemingen
I	24 Maart 1937	tabel 2, figuur 2
II	24 Juni 1937	tabel 19, figuur 12
III	6 Augustus 1937	tabel 6, rechts
IV	6 Augustus 1937	hoofdstuk 18, 1e verhandeling
V	3 November 1937	tabel 23
VI	8 Februari 1938	tabel 24 en tabel 25, links
VII	24 Maart 1938	tabel 32
VIII	3 Mei 1938	tabel 33, rechts

CONCLUSIES

1. Bij het Hofiusprocédé wordt de conserveering inderdaad door de zuurstof onder druk teweeg gebracht. Bij bewaring van rauwe melk onder 10 atm. stikstofoverdruk bij 4°—5° C treedt een bederf van de melk op, ongeveer even snel als en veel gelijkend op dat van melk op gewone wijze bewaard.

2. Bij 4°—5° C ligt de kritische zuurstofoverdruk, boven welke geen bacteriegroei in rauwe melk plaats heeft, niet ver boven 12 atmosfeer.

Bij 1° C ligt de kritische zuurstofoverdruk beneden 10 atmosfeer doch hooger dan 4 atmosferen. Bij deze temperatuur ontwikkelt zich in de rauwe melk een onaangename geur en smaak.

3. Bij gebruik van bacterierijke rauwe melk vindt in de 2de phase van het proces een sterkere bacteriegroei plaats dan bij gebruik van bacteriearme melk. Als het groote aanvangsaantal bacteriën in hoofdzaak uit melkzuurbacteriën bestaat, heeft dit weinig invloed op reuk en smaak. Zijn voornamelijk vervloeiende bacteriën aanwezig, dan worden geur en smaak tijdens het bewaren onder den zuurstofdruk zeer slecht.

4. De bacteriën, die in rauwe melk tijdens de tweede phase van het conserveeringsproces bij 4°—5° C en 10 atm. zuurstofoverdruk groeien, behooren tot de groep der melkzuurbacteriën. Het zijn betacoccen, wier metabolisme zeer veel op dat der aromabacteriën (*Betacoccus cremoris*) gelijk. Bij lageren druk of hoogere temperatuur worden in de zuurstoftanks ook zwakzurende *Streptococcus*soorten gevonden, die echter niet zoo'n hoogen zuurstofdruk kunnen verdragen als de betacoccen.

5. Voor het bewaren van gepasteuriseerde melk onder zuurstofdruk moet de melk in de gesloten tank gepasteuriseerd worden.

In bij 80° C gepasteuriseerde melk vindt onder 10 atm. zuurstofoverdruk en bij 20° C geen bacteriegroei plaats. Smaak en geur worden echter na verloop van tijd zeer slecht. Onder een zuurstofoverdruk van 5 atm. en lager ontwikkelen zich sporevormende bacteriën, die bij de pasteurisatie in leven gebleven zijn. Ook bij deze lagere drukken worden geur en smaak op den duur slecht.

Een langdurige verhitting op 55° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk en bewaring bij 20° C en 10 atm. zuurstofoverdruk (procédé HOFIUS—RICHTER) gaf een beter resultaat wat reuk en smaak betreft. De minste afwijkingen in reuk en smaak vonden wij bij bewaring bij 20° C als de melk in een stikstofatmosfeer op 80° C gepasteuriseerd en onder 10 atm. zuurstofoverdruk bewaard werd.

6. Enkele proeven met *Sc. lactis*, geënt in gesteriliseerde melk, bewezen dat deze bacterie gevoelig is voor zuurstof onder druk, doch dat deze gevoeligheid minder merkbaar is, naarmate de enthoeveelheid grooter is. In mengcultures met de voor zuurstof weinig gevoelige *duplococcon* kwamen deze laatste al spoedig op den voorgrond.

SAMENVATTING

Het onderzoek naar de bewaring van rauwe melk en room volgens het Hofius-procédé werd voortgezet. De conclusies van het vorig onderzoek (1) werden bevestigd. Wat den geur en den smaak van gedurende 2 à 3 maanden bewaarde rauwe melk betreft, bleek, dat de minste afwijkingen geconstateerd werden bij 4°—5° C en 10 atm. zuurstofoverdruk. Bij hogere temperatuur of lageren druk ontstaan diacetylachtige en zurige geuren, bij lagere temperatuur metaalachtige, onaangename geuren. De bacteriologische kwaliteit der te conserveeren melk moet goed zijn. Vooral een in de versche melk aanwezig groot aantal vervloeiende bacteriën heeft slechten invloed op reuk en smaak.

Indien men gepasteuriseerde melk wenscht te conserveeren onder een zuurstofoverdruk van 10 atm. kan men de pasteurisatie uitvoeren vóór het vullen der tank of in de gesloten tank. In het eerste geval moet de melk bij lage temperatuur (4°—5° C) bewaard worden, omdat infectie der gepasteuriseerde melk niet te vermijden is en een soortgelijke bacteriegroei optreedt als in rauwe melk. Bij pasteurisatie op 80° C in de gesloten tank treedt ook tijdens het bewaren bij hogere temperatuur (20° C) onder een zuurstofoverdruk van ongeveer 10 atm. geen bacteriegroei op. Geur en smaak worden echter bij die temperatuur na eenigen tijd zeer slecht. Bewaring van op deze wijze gepasteuriseerde melk bij 4°—5° C geeft slechts weinig geur- en smaakafwijking.

Het beste resultaat bij bewaring van gepasteuriseerde melk bij 20° C onder 10 atm. zuurstofoverdruk werd verkregen bij melk, welke gedurende 5 uren in de gesloten tank onder zuurstofdruk op 55° C verhit was (procédé HOFIUS—RICHTER) en vooral bij melk, welke op 80° C gedurende een half uur in een stikstofatmosfeer gepasteuriseerd was.

In het algemeen worden smaak en geur van room sterker door de zuurstofbewaring beïnvloed dan die van melk.

FURTHER INVESTIGATIONS CONCERNING THE PRESERVATION OF MILK AND CREAM WITH OXYGEN UNDER PRESSURE

CONCLUSIONS

1. The preservation of milk in the HOFIUS-procedure is caused by the oxygen. When raw milk is kept at 4°—5° C and a nitrogen pressure of 10 atmospheres the milk is spoilt nearly as rapidly and nearly in the same way as milk kept under ordinary conditions at this temperature (table 21, fig. 13).

2. With raw milk the critical oxygen pressure, above which the bacterial growth of the second period does not occur, at 4°—5° C generally is over 12 atm. (tables 23, 24; fig. 14, 15).

At 1° C the critical oxygen pressure is below 10 atmospheres, but higher than 4 atm. (table 25, fig. 16). At this low temperature a bad taste and odour develop in the milk.

3. With raw milk, containing a large number of bacteria, the maximal number of bacteria, grown during the second period, is considerably larger than with milk of a low content of bacteria (tables 26, 27; fig. 17). When the large number of bacteria, present at the moment of the filling of the tank, mainly consists of bacteria of the lactic acid type, odour and taste of the milk are not much affected during the keeping period. When the bacteria, initially present, are of the gelatin liquifying type, odour and taste of the milk soon become bad, though these bacteria do not develop.

4. The bacteria, which develop in raw milk at an oxygen pressure of 10 atm. at a temperature of 4°—5° C, are slow acid forming lactic acid bacteria. They are betacocci, according to Orla Jensen's system. Their metabolism resembles very much that of the betacocci of the butter aroma (*Betacoccus cremoris*) (2). At lower oxygen pressures or at higher temperature the milk in the tanks also contains slow acid forming strains of *Streptococcus*.

5. To prevent subsequent contamination, pasteurization of milk to be kept in tanks under oxygen pressure should be effectuated in the closed tank.

No bacterial growth takes place in milk, pasteurized at a temperature of 80° C and kept at 20° C and an oxygen pressure of 10 atmospheres (table 32). Milk, treated in this manner, however develops bad odour and

taste in the course of time. If the oxygen pressure is 5 atmospheres or below, spore-forming bacteria will develop (table 33). Odour and taste also become bad at these lower pressures.

Milk pasteurized under oxygen pressure at 55° C during 5 hours and kept at 20° C (procedure HORIUS—RICHTER) had a much better taste and odour, but they were not unaltered.

The best result concerning taste and odour with a keeping temperature of 20° C, was obtained when milk was heated in the tank at 80° C in an atmosphere of nitrogen and when the nitrogen after cooling of the tank was replaced by oxygen at a pressure of 10 atm.

6. It was proved in experiments with sterilized milk, inoculated with starter lactic acid streptococci that these bacteria are less resistant to the action of oxygen under pressure the smaller the inoculum is (table 35, 36). In mixed cultures with oxygen resisting diplococci the latter organisms soon made up the whole of the bacterial flora (table 37).

SUMMARY

The investigations concerning the preservation of raw milk and cream according to the HORIUS procedure have been continued. The conclusions of our previous work were verified. Odour and taste of milk, kept during 2—3 months, are the least affected at 4°—5° C and an oxygen pressure of 10 atmospheres *). At higher temperature or lower oxygen pressure diacetyl-like and acid odours are formed; at lower temperature metallic, disagreeable odours develop. The bacteriological quality of the milk to be kept ought to be good. A large number of liquifying bacteria in the fresh milk causes bad odour and taste.

If pasteurized milk is to be kept at an oxygen pressure of 10 atm. the pasteurization can be effectuated before the filling of the tank or in the closed tank. In the former case the milk should be kept at low temperature (4°—5° C) as it is easily contaminated during the filling of the tank and bacteria will develop as in raw milk. If the milk is pasteurized at 80° C in the closed tank, no bacterial growth will occur, when it is kept at an oxygen pressure of 10 atm., even not at a temperature of 20° C. After some time however a very bad odour and taste develop at the keeping temperature of 20° C. If the milk, pasteurized in this way, is kept at 4°—5° C, odour and taste are only very slightly affected.

*) In this article the oxygen pressure is expressed as the number of atmospheres over the atmospheric pressure.

