RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN

PROPIONZUURBACTERIËN IN GOUDSCHE EN EDAMMER KAAS

DOOR

J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE

(Ingezonden: 12 November 1941)

1. Propionzuurbacteriën

De propionzuurbacteriën vormen een aparte groep van bacteriën, die hun naam ontleenen aan de vorming van propionzuur, hetwelk zij bij de vergisting van suikerachtige stoffen of van melkzure zouten doen ontstaan. Behalve propionzuur wordt ook azijnzuur en als gasvormig product kooldioxyde (koolzuur) gevormd. Bij de propionzuurgisting ontstaat geen waterstofgas. De gisting geschiedt onder anaerobe omstandigheden.

De bacteriën vormen geen sporen. Pasteurisatie kunnen zij dus niet verdragen.

Door hun vermogen tot vergisting van lactaten bij afsluiting van de lucht kan men verwachten, dat de propionzuurbacteriën echte kaasbacteriën zijn. Zij vinden in kaas met haar eiwit en melkzure zouten een goeden voedingsbodem. Hoewel er propionzuurbacteriën zijn, die ook melksuiker kunnen vergisten, zal toch een melksuikervergisting in de kaas door propionzuurbacteriën niet mogelijk zijn, daar door den zeer snellen groei der melkzuurbacteriën in de pas gemaakte kaas de langzaam groeiende propionzuurbacteriën eerst eenige merkbare ontwikkeling zullen gaan vertoonen als reeds alle lactose omgezet is. Zij zijn dus in staat om zich tijdens het bewaren van kaas te vermeerderen.

De propionzuurbacteriën zijn dan ook in hoofdzaak in kaas gevonden en wel speciaal in kaas van het Emmentaler type. De onderzoekers, die zich met dit type kaas bezig houden, zijn over het algemeen van oordeel, dat de „oogenvorming", welke voor deze kaas karakteristiek is, aan de werkzaamheid van propionzuurbacteriën moet worden toegeschreven. Hoewel het vreemd moge schijnen, dat het gemakkelijk in waterige vloeistoffen, dus ook in kaasvocht, oplosbare koolzuurgas, hetwelk de propionzuurbacteriën bovendien in slechts matige hoeveelheden produceeren, openingen in het zuivel kan veroorzaken tegen den druk van de kaasmassa en de omsluitende kaaskorst in, vindt deze opvatting steun in het feit, dat het gistingsgas in

1154005

de Emmentaler kaas uit kooldioxyde bestaat. Er moet hierbij echter opgemerkt worden, dat ook wat stikstofgas aanwezig is.

Behalve de gasvorming wordt ook het typische aroma van Emmentaler kaas aan propionzuurbacteriën toegeschreven.

2. Historisch overzicht

Nadat ORLA JENSEN (24) in 1904 had aangetoond, dat in Emmentaler kaas de vluchtige vetzuren voor een belangrijk deel uit propionzuur bestonden, beschreven hij en VON FREUDENREICH (20) in 1906 de ontdekking, isolatie en eigenschappen van bacteriën, die in kaas voorkomen en propionzuur vormen. Voor de isolatie gebruikten zij als „voedingsvloeistof een pepton-Ca-lactaat-oplossing. Na ophooping der bacteriën hierin werd geënt in weiagar, waarin de propionzuurbacteriën als hoekige koloniën groeien. Zij vonden ook reeds, dat reinculturen dezer bacteriën inderdaad uit melksuiker en uit Ca-lactaat de gistingsproducten: propionzuur, azijnzuur en koolzuur vormen en dat de verhouding der moleculaire hoeveelheden gevormd propionzuur en azijnzuur ongeveer 2 is. Bij kaasproeven zagen zij, dat enting met propionzuurbacteriën de oogenvorming bevorderde in die gevallen, waarin de ongeënte kaas tot te geringe oogenvorming neigde. Op grond daarvan schreven zij de oogenvorming aan de propionzuurbacteriën toe, doch merkten op, dat ook in kaas zonder propionzuurbacteriën wel propionzuur en oogen ontstonden.

Hoewel men van dit onderzoek belangrijke practische resultaten zou verwacht hebben, is van een nadere studie der propionzuurbacteriën in Zwitserland daarna niet veel vernomen. THÖNI en ALLEMANN (29) ontdekten roode propionzuurbacteriën, die zij aanwezen als oorzaak van af en toe in Emmentaler kaas voorkomende roode punten.

Geïnspireerd door Amerikaansche onderzoekingen, is de studie omstreeks 1930 weer opgevat. KOESTLER en HOSTETTLER (22) vermeldden in 1931, dat in vele gevallen van ongewenschte „nagisting", dit is dus een gisting, welke optreedt na de „hoofdgisting", ook, evenals bij de hoofdgisting, alleen koolzuurgas ontstaat. Terwijl zij in vroeg-los kazen (gisting door coliachtigen) steeds veel waterstof in het kaasgas vonden, was in de bedoelde gevallen van nagisting het percentage waterstof, berekend op het kooldioxyde-waterstof-mengsel (dus zonder het steeds mede aanwezige stikstof- en zuurstofgas), nooit hooger dan 2 %, evenals bij gas, gevormd gedurende de hoofdgisting. Zij concludeerden daaruit, dat dus bij dergelijke nagistingen ook propionzuurbacteriën betrokken waren. In het kaasgas werden ook altijd stikstof en zuurstof gevonden. De verhouding, waarin deze twee gassen voorkwamen, was altijd grooter dan 4, soms zelfs meer dan 100, hetgeen zou kunnen bewijzen, dat het gistingsgas voor een deel uit stikstof bestaat.

HOSTETTLER (21) zette dit onderzoek voort en vond de aanwezigheid van waterstof in kazen met boterzuurbacteriën, doch van bijna uitsluitend koolzuur in vele gevallen van gasvorming, die in hun vorm van de normale oogenvorming afweken.

In 1936 vermeldden DORNER en THÖNI (9), dat zij met behulp van een uit Noord-Amerika afkomstige methode in staat waren directe tellingen van propionzuurbacteriën uit te voeren. Deze methode maakt gebruik van peptongistextract-Na-lactaat-agar, waarin karakteristieke koloniën ontstaan. In melk vonden zij zeer uiteenloopende aantallen van propionzuurbacteriën. In 70 % der onderzochte gevallen was het aantal minder dan 5 per ml, in abnormale gevallen werden meer dan 10 000 per ml gevonden. In kaasbakmelk was het aantal meestal geringer dan 100. In koemest bleef het gewoonlijk beneden 30 000 per g; in varkensmest was het hooger. Ook in zuursels en zelfbereide leb werden propionzuurbacteriën gevonden.

In hetzelfde jaar publiceerden deze onderzoekers (10) proeven met reinculturen van propionzuurbacteriën. Zij bepaalden levensduur, gevoeligheid voor hooge temperaturen (welke van belang is met het oog op de hooge nawarmtemperatuur van Emmentaler kaas) en generatietijd. De laatste bleek bij 30° C 1½ à 12 uur te zijn, bij 22° 14—35 uur en bij 17° 26—38 uur. De bacteriën groeien bij gewone temperatuur dus langzaam. De gunstigste pH voor hun ontwikkeling is 6,8—7,0, doch reinculturen vertoonen groeimogelijkheid in een pH-gebied van 4,6—8,5.

Uit kaasproeven van DORNER, LANGHARD, MOSIMANN en RITTER (11) werd in 1938 geconcludeerd, dat voor een goede oogenvorming een minimum van 50 à 100 propionzuurbacteriën in de 24 uur oude kaas aanwezig moet zijn. Is eenmaal dit minimum-aantal aanwezig, dan heeft een op dat oogenblik aanwezig hooger aantal alleen invloed op de snelheid, waarmede de oogen gevormd worden. DORNER en MOSIMANN (12) besluiten dan ook, dat de invoering van propionzuurbacteriënculturen voor de Emmentaler kaasbereiding nuttig kan zijn en dat men zich over de noodzaak van enting beter kan oriënteeren in 24 uur oude kaas dan in de kaasbakmelk, daar bij het hooge nawarmen veel propionzuurbacteriën sterven.

Volgens mededeeling van BURRI (5) is men reeds in 1925 begonnen met het afleveren van z.g. P-cultuur aan kaasbedrijven.

In 1939 wezen DORNER en THÖNI (14) op het bestaan van coccusvormige propionzuurbacteriën.

Een overzicht van de Zwitsersche onderzoekingen vindt men in een artikel van DORNER in Le Lait van 1939 (13).

In Noord-Amerika, waar ook veel kaas van Emmentaler type

gemaakt wordt (Swiss domestic cheese) zijn verschillende onderzoekingen gedaan.

In 1912 toonde CLARK (6) aan, dat kaas met normale oogenvorming slechts koolzuur en stikstof bevat. Hij verklaart de aanwezigheid van stikstof door bij de bereiding ingesloten lucht, waaruit de zuurstof geabsorbeerd is. Hij merkt evenwel op, dat er in dergelijke kazen meer koolzuur voorkomt dan uit de aanwezige hoeveelheid propionzuur te verklaren is.

ELDREDGE en ROGERS waren in 1914 (15) nog in onzekerheid door welke bacteriën het gas der oogen gevormd werd. Zij vonden bijv. in kaas met mooie oogen soms maar weinig propionzuurbacteriën. Zij raadden daarom liever aan de kaasmelk te enten met een weinig goede kaas dan met bacteriënculturen.

SHERMAN (27) beschreef in 1921 de isolatie van propionzuurbacteriën met vloeibare voedingsbodems, waarin geen Ca-lactaat, doch Na-lactaat gebruikt werd. Ook gebruikte hij voor directe isolatie reeds gist-pepton-Na-lactaat-agar. Met den Na-lactaat-bodem vond hij gemiddeld 100 × hoogere propionzuurbacteriënaantallen dan met de Ca-lactaat-vloeistof. In zijn kaasproeven zag hij een uitstekend effect van de enting met propionzuurbacteriën op de oogenvorming. In 1924 (28) deelde hij mede, dat 5 jaren ervaring geleerd hadden, dat de propionzuurbacteriënculturen een gunstigen invloed uitoefenen op de ontwikkeling van de eigenschappen van kaas van het Emmentaler type. In een tweetal artikelen (26 en 27) beschreef hij de eigenschappen van door hem geïsoleerde propionzuurbacteriën.

Andere onderzoekingen werden gedaan door FRAZIER. In 1931 (16) publiceerde hij onderzoekingen over groeisnelheid en gevoeligheid voor verschillende factoren, als ouder worden der culturen en hooge temperatuur. Door tellingen vond hij, dat bij 12° C in kaas geen ontwikkeling optrad en dat bij 22° C de snelle groei pas na 3 of 4 weken geschiedt. In 1932 (17) spreekt hij twijfel uit over de oogenvorming door propionzuurbacteriën, daar hij vermeldt, dat tijdens de vorming der oogen tetracoccen en kleine streptobacteriën overheerschen, terwijl de sterke groei der propionzuurbacteriën pas na de oogenvorming komt. Ook vond hij gevallen van mooie oogenvorming bij kazen, die slechts 100 propionzuurbacteriën per g bevatten. Bij latere studies (18 en 19), waarbij hij tellingen verrichtte in buizen met gistextract-pepton-Na-lactaat-agar, vond hij geen toename van propionzuurbacteriën in den kaasbak en tijdens het persen.

BABEL en HAMMER (2) vonden geen duidelijk verband tusschen het aantal voorkomende propionzuurbacteriën en de oogenvorming. Zij deden kaasproeven met gepasteuriseerde melk, die met verschillende stammen van propionzuurbacteriën geënt werd, doch bij hun vele proeven is geen enkel

voorbeeld van een contrôlekaas zonder oogen en een overeenkomstige proefkaas met oogen. Er waren zelfs gevallen van goede oogenvorming bij slechts 10 propionzuurbacteriën per gram. Hun conclusies hebben meer betrekking op geur en smaak van de kaas en zij vonden met verschillende stammen een duidelijke verbetering in dit opzicht, hetwelk zij verklaren door de smaakverbeterende werking van propionzure zouten (1).

In zijn commentaar op dit artikel komt BABEL (3) dan ook tot de conclusie, dat er nog andere bacteriën moeten zijn, die de oogen veroorzaken.

Van de in Duitschland verrichte onderzoekingen halen we slechts die van DOMKE, RODENKIRCHEN en DEMETER aan.

DOMKE (7) vond propionzuurbacteriën in Emmentaler, Tilsiter, Goudsche en Edammer kaas. RODENKIRCHEN (25) toonde in 5 Tilsiter kazen van 18 000 tot 330 000 propionzuurbacteriën per g aan.

DEMETER (8) merkt op, dat propionzuurbacteriën blijkbaar normaal in kaas voorkomende bacteriën zijn en acht ze mogelijk van belang voor de Emmentaler kaasrijping en voor het kaasaroma. Zij ontwikkelen zich pas na het zouten van de kaas en bereiken hun maximum-aantal na ongeveer 2½ maand. Hij onderzocht een aantal kazen van verschillend type en verschillende herkomst en vond in voor de consumptie rijpe kazen: Emmentaler kaas uit Zwitserland 195 millioen, uit Weiler 62 millioen, uit Weihenstephan 67 millioen; Engelsche Chester kaas 500—1,2 millioen; Edammer enkele; Duitsche Edammer 25 000—50 000; Tilsiter 18 millioen; smeltkaas bijna geen propionzuurbacteriën per gram.

Gevallen van gisting in de laatstgenoemde kaas kon hij niet verklaren door een werking van propionzuurbacteriën.

In Nederland heeft de studie der propionzuurbacteriën zich beperkt tot een onderzoek van VAN NIEL (23), die zich hoofdzakelijk bezighield met de door deze bacteriën veroorzaakte omzettingen en tevens aangaf hoe de verschillende soorten van propionzuurbacteriën zich van elkander onderscheiden. Hij isoleerde verschillende bacteriestammen uit zuivelproducten en het mocht hem zelfs gelukken ook in grond propionzuurbacteriën aan te toonen. Acht der door hem onderzochte stammen waren afkomstig uit Edammer en Goudsche kazen.

Volledigheidshalve willen wij nog vermelden, dat BOEKHOUT en OTT DE VRIES (4) bij hun onderzoekingen naar de z.g. „normale gasvorming" in Edammer kaas dezelfde cultuurvloeistof gebruikten als FREUDENREICH en ORLA JENSEN. Hierbij viel hun aandacht echter op andere lactaatvergistende bacteriën, de z.g. boekelscheurbacteriën, die van propionzuurbacteriën sterk verschillen, b.v. door de vorming van waterstof.

Uit het voorgaande moge blijken, dat de onderzoekers op het gebied der zuivelbacteriologie steeds een groote belangstelling voor de aanwezigheid van propionzuurbacteriën in kaas gehad hebben. Bij het bestudeeren van de vele onderzoekingen valt het echter op, dat er nog geen algemeen aanvaard standpunt gevormd is betreffende de beteekenis van deze bacteriën voor de eigenschappen van kaas. Hoewel men wel sterk geneigd is aromavorming en gasvorming in kazen van het Emmentaler type aan propionzuurbacteriën toe te schrijven, wordt hieraan van tijd tot tijd ook weer getwijfeld.

3. Doel van het onderzoek

Aangezien van het begin af door zuivelonderzoekers in Zwitserland en Noord-Amerika verband werd gezocht tusschen propionzuurbacteriën en de typische oogenvorming bij kazen van het Emmentaler type, heeft de studie der propionzuurbacteriën zich voornamelijk tot deze kaassoort beperkt. Daar uit de gegevens blijkt, dat propionzuurbacteriën typische kaasbacteriën zijn, leek het ons, ter verkrijging van een betere kennis omtrent de bacteriënflora van Edammer en Goudsche kaas, gewenscht ons te oriënteeren over een eventueel voorkomen van propionzuurbacteriën in deze kaassoorten en wel tevens over het aantal, waarin zij in deze kaassoorten voorkomen. Het geringe aantal gegevens in de literatuur geeft daarover geen voldoende inzicht. Indien het zou blijken, dat ook in de Nederlandsche kaassoorten propionzuurbacteriën aangetroffen worden, zou het gewenscht zijn eventueele wetmatigheden over de oorzaken van de aanwezigheid van verschillende aantallen op te sporen. In de literatuur wordt een sterke afhankelijkheid van het aantal in kaas voorkomende propionzuurbacteriën toegeschreven aan het aantal bij het begin van de kaasbereiding aanwezige bacteriën en wordt aan omstandigheden, welke hierop invloed kunnen uitoefenen, geen aandacht gewijd. Slechts de temperatuur wordt in dit verband wel eens genoemd.

Zoo mogelijk wilden wij trachten te bepalen of propionzuurbacteriën van beteekenis zouden zijn voor Edammer en Goudsche kaas, hetzij ten nadeele door een ongewenschte gasvorming hetzij ten voordeele door een gunstigen invloed op de kaasrijping, b.v. wat betreft geur en smaak. Wij moeten hierbij bedenken, dat er tusschen Emmentaler kaas en Goudsche of Edammer kaas een groot verschil is. De eerste wordt gedurende een bepaalde periode in ruimten van hooge temperatuur geplaatst. In Goudsche en Edammer kaas wordt in rijpen toestand wel dikwijls een geringe gasvorming verlangd, waarbij enkele mooie ronde oogjes het aanzien van de doorsnede verlevendigen, doch een zóó sterke gasvorming als in Emmentaler ontstaat zou als ongewenscht „laat-los" worden beschouwd. De gewenschte „hoofdgisting" in Emmentaler

zou voor Edammer of Goudsche kaas geacht worden een schadelijke „nagisting" te zijn, waarbij wij onder *nagisting* verstaan iedere gasvorming, die na de pekeling van de kaas begint.

Er waren ons nu vele gevallen bekend van nagisting in praktijkkazen, waarbij talrijke groote of kleinere ronde openingen in het zuivel aanwezig waren, terwijl de oorzaak hiervan op grond van bacteriologische analysen niet aan de werking van boterzuur- of boekelscheurbacteriën kon worden toegeschreven. Dit gaf ons aanleiding om na te gaan of in deze gevallen propionzuurbacteriën oorzaak van de overmatige gasontwikkeling konden zijn. In andere gevallen van geringe gasontwikkeling in Edammer kaas, waarvan vroeger de oorzaak werd toegeschreven aan boekelscheurbacteriën en waar wij er evenmin in slaagden deze bacteriën aan te toonen, zouden mogelijk de propionzuurbacteriën een verklaring voor deze gasvorming kunnen geven.

4. De voor aantoonen en tellen van propionzuurbacteriën gebruikte techniek

Bij de methoden voor het aantoonen van propionzuurbacteriën maakt men gebruik van de eigenschap van deze bacteriën om lactaten aan te tasten. Men ent dus het te onderzoeken materiaal in voedingsbodems, welke melkzure zouten als koolstofbron bevatten. Een suikerhoudende bodem zou voor het doel niet geschikt zijn, omdat hierin de melkzuurbacteriën te veel op den voorgrond treden, hetgeen niet het geval is in lactaatmedia.

Ook wij hebben lactaatvoedingsbodems gebruikt. Hoewel wij dikwijls bevredigende resultaten verkregen met een vloeibaren voedingsbodem (pepton-Ca-lactaat) en van de vaste bodems kaasgelatine en pepton-lactaat-gelatine ook voldeden, bevonden wij ons het best bij een *lactaat-agar-bodem*, zooals door DORNER en THÖNI gebruikt werd. Dezen bereiden wij als volgt:

20 g poedervormig agar-agar wordt in een kolf overgoten met 500 ml gedestilleerd water, 3 à 4 dagen bij 20° C geplaatst en dagelijks éénmaal omgeschud. Dan wordt gefiltreerd door neteldoek in een Buchnertrechter onder afzuigen en het residu weer met 500 ml water overgoten en nogmaals 3 à 4 dagen bij 20° C geplaatst. Na afzuigen en eenigszins uitwasschen wordt het residu opgelost in 700 ml water. Hierbij wordt gevoegd 250 ml vloeistof, die verkregen is door 5 g pepton Witte, 15 g Na-lactaat (25 g 60 % Na-lactaatstroop) en 50 ml gistautolysaat [1]) in water tot een volume van 250 ml te brengen. Na een half uur koken van het mengsel, waarna het gewicht met water tot 1 kg gebracht wordt, wordt afgekoeld, 5 g albumine opgelost en 20 minuten in den stoompot verhit. Na filtreeren wordt de pH op 6,5 gebracht,

[1]) Zie voor de bereiding van gistautolysaat: J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE. Suikervergistende en lactaatvergistende boterzuurbacteriën. *Versl. v. landbk. Onderz. 40* (1934) 543. Jaarverslag der Proefzuivelboerderij over 1933, 119.

de vloeistof in porties van 10 ml in buizen getapt en gesteriliseerd gedurende 10 min. bij 120° C.

Vóór de enting worden de buizen in een stoompot verhit om de agar te doen smelten en in een waterbad van ongeveer 50° C geplaatst tot zij geënt zijn. Na de enting wordt de agar doorgeroerd met een geflambeerde platinadraad, aan het einde waarvan zich een oog bevindt, hetwelk met zijn vlak loodrecht op den draad staat. Daarna wordt de watteprop een eindje in de buis gedrukt en bevochtigd met 0,5 ml 20 % pyrogallol-oplossing, daarna met 0,5 ml verzadigde soda-oplossing en direct gesloten met een vochtige gummistop; hiermede wordt de zuurstof geabsorbeerd en aldus een anaerobe cultiveering verkregen. Na stollen worden de buizen bij 30° C geplaatst en na 12—14 dagen beoordeeld. Men kan de propionzuurbacteriënkoloniën in die buizen tellen, waarin er niet meer dan 50 aanwezig zijn. Men moet dus enten met verschillende verdunningen en iedere verdunning minstens in tweevoud. De koloniën der propionzuurbacteriën zijn gekarakteriseerd door meestal flinke afmetingen. Door hun grootte vallen zij dadelijk op. Meestal zijn zij lensvormig of drievleugelig; dikwijls hebben zij een zesvleugeligen vorm, ontstaan doordat van een kernpunt uit de ruimte door als cirkels begrensde vleugels in vieren is verdeeld (zie foto's A en B). Soms gaat de onderverdeeling der vleugels zóó ver, dat een sponsachtige kolonie ontstaat. Deze vormen zijn niet speciaal karakteristiek voor propionzuurbacteriënkoloniën. Zij ontstaan doordat de koloniën bij hun groei den samenhang van den agar in bepaalde richtingen verzwakken. Ook gasbellen kunnen in agar soms dergelijke vleugelvormen aannemen (zie foto E). De foto's der gipsmodellen (C en D) geven een indruk van den bouw der koloniën. De koloniën zijn altijd gekleurd, van geel-lichtbruin tot fel donkerrood toe (een enkelen keer namen wij zelfs zwarte koloniën waar). In de agarbuizen ontwikkelen zich ook nog wel andere bacteriën tot koloniën. Soms vormen ook deze vleugelkoloniën, echter zijn de propionzuurbacteriën gemakkelijk aan kleur en grootte te herkennen. Er blijven altijd wel enkele gevallen, waarin bij de kolonietelling eenige onzekerheid is. Soms vormt zich in de agarbuizen een gasscheur en dan kan de telling moeilijkheden geven, omdat het dan voorkomt, dat de propionzuurbacteriën langs de wanden der scheuren groeien en men de afzonderlijke koloniën niet meer uit elkander kan houden.

In plaats van met agar kan men den lactaatbodem ook bereiden met kiezelzuur. Men werkt hierbij met 2 vloeistoffen. De vloeistof A bereidt men door in 200 ml gedestilleerd water + 25 ml gistautolysaat 2,5 g pepton Witte op te lossen (even koken) en na afkoeling hieraan toe te voegen 12,5 g 60 % Na-lactaatstroop en 18 ml 25 % phosphorzuur. Na filtreeren wordt getapt in buizen (5 ml per buis) en gesteriliseerd. De vloeistof B is een waterglas-

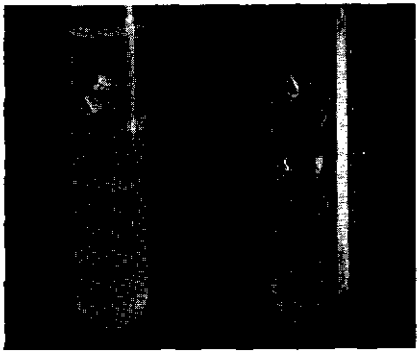

Foto A
Koloniën van propionzuurbacteriën in buizen met agarvoedingsbodem

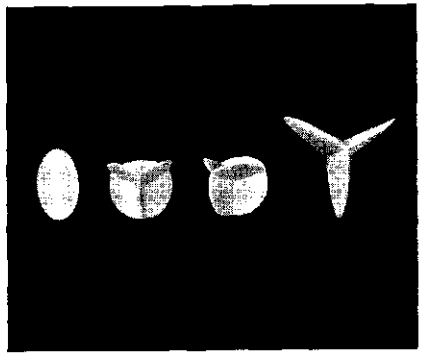

Foto B
Gipsmodellen van propionzuurbacteriën-koloniën, zooals die in agarbodems ontstaan

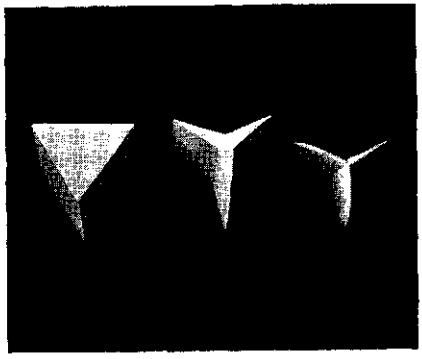

Foto C
Constructie van een koloniemodel uit een prisma

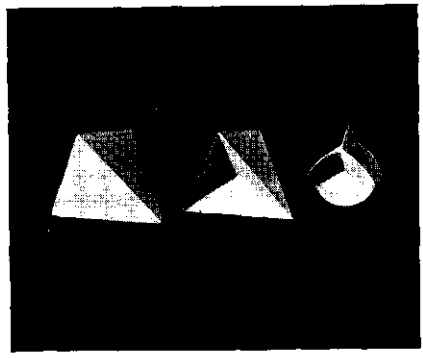

Foto D
Constructie van een koloniemodel uit een tetraëder

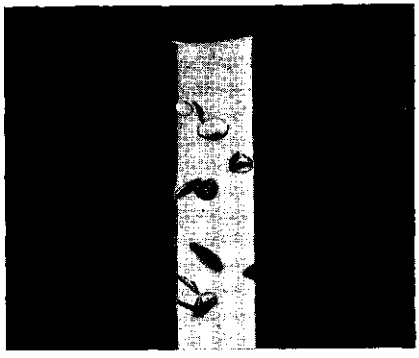

Foto E
Gistingsgasbellen in een buis met agar-voedingsbodem

Foto F
Microfoto van propionzuurbacteriën. Lineaire vergrooting 2000 ×

oplossing, die bereid wordt door aan 30 g gesteriliseerd waterglas 225 ml gesteriliseerd gedestilleerd water toe te voegen. Deze verdunde oplossing wordt met een steriele pipet in gesteriliseerde buizen gebracht en in iedere buis wordt zooveel gepipeteerd, dat na toevoeging hieraan van 5 ml van oplossing A de pH 6,5 is. Men ent in de buis B en voegt dan den inhoud van een buis met 5 ml A hieraan toe. Direct daarna wordt goed geroerd met het platina oog en de buizen worden gesloten als de agarbuizen, dus met gebruik van pyrogallol en gummistop. Het kweeken geschiedt ook hier gedurende 12—14 dagen bij 30° C, daar de propionzuurbacteriën slechts langzaam groeien.

Thans willen wij enkele gegevens laten volgen, welke eenig inzicht geven in de betrouwbaarheid der gevonden getallen. In tabel 1 wordt daartoe aangegeven hoeveel propionzuurbacteriënkoloniën werden geteld in verschillende kaasverdunningen in den agarbodem. Onder verdunning 1—8 wordt verstaan een enting van 10^{-1} tot 10^{-8} g kaas per agarbuis. Deze entingen geschiedden in duplo. De getelde koloniënaantallen der duplo-bepalingen zijn in de tabel door een streepje gescheiden.

TABEL 1

Aantal propionzuurbacteriënkoloniën in agarbuizen, geënt met verschillende hoeveelheden kaas

Kaas	Verdunning								Aangenomen aantal per g
	1	2	3	4	5	6	7	8	
M 1	± 100	12—12	1—3	0—0	—	—	—	—	1 200
O 1	26—30	2—4	0—0	—	—	—	—	—	300
U B 3	12—14	0—1	0—1	0—0	—	—	—	—	130
N h	—	± 200	20—20	1—2	0—0	—	—	—	20 000
P 1	—	15—25	2—2	0—0	—	—	—	—	2 000
F 32	—	± 10	1—1	—	—	—	—	—	1 000
A 3	—	6—6	0—1	0—0	—	—	—	—	600
F 3	—	—	36—40	2—5	0—0	—	—	—	40 000
I *a* 1	—	—	17—23	0—2	0—0	—	—	—	20 000
X B 3	—	—	27—29	2—4	0—0	—	—	—	28 000
K 1	—	—	—	± 60	4—8	0—2	0—0	—	600 000
U J K	—	—	—	12—16	1—2	0—0	—	—	140 000
Q 2	—	—	—	—	62—70	7—8	0—0	—	7 000 000
T 3	—	—	—	—	25—31	2—2	0—0	—	2 800 000
U *b* 2	—	—	—	—	—	12—13	0—1	0—1	12 000 000
O 3	—	—	—	—	—	22—24	0—3	0—1	23 000 000
P 4	—	—	—	—	—	—	17—31	2—5	295 000 000

Men ziet, dat de duplotellingen overeenkomstige resultaten geven en dat bij een tienmaal grootere verdunning ook ongeveer tien maal minder

bacteriën gevonden worden. Voor de opgave van het bacteriënaantal werd hoofdzakelijk gebruik gemaakt van de tellingen van buizen, waarin van 10 tot 50 koloniën voorkwamen. De tellingen in buizen met zeer geringe aantallen werden slechts als contrôle gebruikt; hierbij is n.l. de kans op toevalligheden te groot. Buizen met meer dan 50 koloniën konden meestal niet geteld worden, doch bij een niet al te groot aantal kon men duidelijk waarnemen, dat in deze buizen het aantal koloniën ongeveer tien maal zoo groot was als in de volgende verdunning.

Er deden zich ook wel gevallen voor, dat het resultaat van de kolonietelling minder mooi was dan in tabel 1. Tabel 2 geeft hiervan op dezelfde wijze een aantal voorbeelden. Toch kon ook in deze gevallen wel een schatting van het bacterieaantal gemaakt worden. Tenslotte blijven alle bacterietellingen slechts opgaven van meer of minder waarschijnlijke waarden.

TABEL 2

Kaas	Verdunning								Aangenomen aantal per g
	1	2	3	4	5	6	7	8	
B 6	—	51—58	1—5	0—0	—	—	—	—	5 400
E 4	—	25—41	0—4	0—0	—	—	—	—	3 300
E 3	—	8—24	0—1	0—0	—	—	—	—	1 600
18	—	—	70–100	2—5	0—0	—	—	—	80 000
Z 2	—	—	36—48	0—3	0—1	—	—	—	42 000
T 1	—	—	34—34	1—1	0—0	—	—	—	34 000
Z B 2	—	—	76–150	0—2	0—5	—	—	—	115 000
35	—	—	—	± 100	7—18	1—1	0—0	—	1 200 000
K 3	—	—	—	34—46	8—8	0—0	—	—	600 000
K 2	—	—	—	—	67—91	4—9	1—1	0—0	7 900 000
T 3	—	—	—	—	33—65	0—2	0—0	—	4 900 000
B *b* 1	—	—	—	—	—	55—55	1—2	0—0	55 000 000
F 1	—	—	—	—	—	43—62	5—6	0—0	50 000 000
S 3	—	—	—	—	—	—	16—20	4—4	250 000 000

In het begin van het onderzoek achtten wij het noodig om te bewijzen, dat de verrichte tellingen inderdaad op propionzuurbacteriën betrekking hadden. Daarom werden vele der bacteriën uit agarbuizen rein gekweekt en nader bestudeerd.

De bacteriën waren Grampositief en bevatten katalase. Zij waren anaerob, hoewel soms in entstrepen op aerobe oppervlakteplaten een zeer geringe groei werd waargenomen, als zeer zwaar geënt werd. Zonder uitzondering vormden zij in lactaatvloeistoffen koolzuurgas, hetgeen echter niet door gistingsverschijnselen zichtbaar was.

Bepalingen van propionzuur werden gedaan met culturen in 400 ml pepton-Na-lactaat-oplossing (2 % pepton; 0,05 % K_2HPO_4; 0,02 % $MgSO_4$; 1,5 % Na-lactaat). 250 ml der uitgegroeide cultuur werd met 50 ml n/l zwavelzuur onderworpen aan een destillatie met stoom tot 1 l destillaat verkregen was. Dit werd geneutraliseerd en ingedampt tot 100 ml. Aan deze 100 ml werd 10 ml n/l zwavelzuur toegevoegd en gefractioneerd gedestilleerd onder aanvulling met heet water na afdestilleeren van iedere fractie van 30 ml. Aldus werd in 7 stammen gevonden na 11—15 dagen kweeken:

Stam	Mg per l		Moleculaire verhouding
	Azijnzuur	Propionzuur	
v. N. I	314	3022	1 : 7,8
v. N. II	823	2374	1 : 2,3
1 N	1207	5277	1 : 3,5
Emm. *a*	1288	4524	1 : 2,8
3 K	1115	4660	1 : 3,4
1 D	834	3994	1 : 3,9
J r.	1429	5102	1 : 2,9

Later zijn directe bepalingen uitgevoerd door gefractioneerde destillatie van de culturen zelf en werd gevonden:

Stam	Mg per l		Moleculaire verhouding
	Azijnzuur	Propionzuur	
v. N	1210	2550	1 : 1,71
1 N	1340	2780	1 : 1,69
1 N	1150	2740	1 : 1,94

Bij deze, betrouwbaardere wijze van bepaling is de verhouding der twee zuren dichter bij de theoretische. Uit de cijfers blijkt, dat de propionzuurbacteriën groote hoeveelheden propionzuur en azijnzuur produceeren. In tegenstelling tot de boterzuurgisting, waarbij uit 2 moleculen melkzuur 1 molecule boterzuur ontstaat en dus tijdens de gisting de pH van de gistingsvloeistof oploopt, is er bij de propionzuurgisting geen verandering in de hoeveelheid zuur, daar volgens de formule:

$$3\ CH_3.CHOH.COOH \rightarrow 2\ CH_3.CH_2.COOH + CH_3.COOH + CO_2 + H_2O$$

uit 3 moleculen melkzuur 2 moleculen propionzuur + 1 molecule azijnzuur ontstaan. Tijdens de gisting kan er dus slechts een geringe pH-verhooging

optreden, daar azijnzuur en propionzuur iets zwakkere zuren zijn dan melkzuur. Bij enkele stammen, die in pepton-Na-lactaat werden gekweekt, was na 15 dagen bij 30° C de pH resp. 5,94; 6,00; 6,06 en 6,11, terwijl die van de ongeënte vloeistof 5,94 was.

In glucosepepton werd door alle onderzochte stammen zuur gevormd. De uit kaas geïsoleerde stammen tastten ook lactose aan, doch in saccharosepepton werd door deze geen zuur gevormd. Onder anaerobe omstandigheden werd bij 30° C door bijna alle uit kaas geïsoleerde en onderzochte stammen melk tot stremming gebracht, waarbij soms hooge zuurgraden ontstonden, n.l. tot wel 15 ml n/l zuur per 100 ml centrifugemelk.

Bij een pH van 5,00 werd nog goede groei van de propionzuurbacteriën verkregen in glucose- of lactosepepton. In de lactaat-agar groeiden zij nog bij pH 5,15.

Op grond van de bovengenoemde eigenschappen was het niet aan twijfel onderhevig, dat de onderzochte bacteriënstammen inderdaad propionzuurbacteriën waren. Daarom hebben wij het niet noodig geoordeeld om de bij het onderzoek van verschillende kazen getelde, typische propionzuurbacteriënkoloniën voor ieder geval te identificeeren.

5. Techniek van het onderzoek van kaas

Van de te onderzoeken kaas werd een deel van het oppervlak (bij Goudsche kaas van een der platte oppervlakken) met een gasbrander geflambeerd en een tweetal boorsels genomen met geflambeerde boren. Op een geflambeerd horlogeglas werd uit ieder boorsel 1 g kaas afgewogen in schijfjes, welke op de boor met een geflambeerd mesje uit het boorsel werden gesneden. Dit werd gedaan om uit de kaas een gemiddeld monster te nemen en om dus niet het gevaar te loopen een toevallig monster van één plaats te onderzoeken. De 2 g kaas werden nu in een gesteriliseerden mortier met een gesteriliseerden stamper fijngewreven onder toevoeging bij kleine hoeveelheden tegelijk van in totaal 18 ml 2 % Na-citraat-oplossing, welke gesteriliseerd was en op ongeveer 50° C verwarmd was. Om een goede suspensie te krijgen verdient het ook aanbeveling den mortier van te voren op 40° à 50° C te verwarmen.

In kolven met 99 ml gesteriliseerd water werden nu met gesteriliseerde pipetten verdunningen gemaakt door 1 ml uit den mortier over te brengen in de eerste kolf met water, hieruit 1 ml in de tweede kolf en hieruit 1 ml in een derde kolf. Uit mortier en kolven werd in tweevoud 1 en 0,1 ml in de agarbuizen geënt, zoodat een reeks verkregen werd van agarbuizen, welke geënt waren met 0,1; 0,01; 0,001 tot één honderdmillioenste g kaas.

6. Propionzuurbacteriën in practijkkazen

In den loop van enkele jaren (Jan. 1939—Aug. 1941) hebben wij een groot aantal kazen onderzocht op propionzuurbacteriën. Door welwillende medewerking van de Rijkszuivelconsulenten voor Zuid-Holland en Utrecht, „de Producent" te Gouda en den Bond van Coöperatieve Zuivelfabrieken in Friesland waren wij in staat op kaaskeuringen, kaasdagen en in bewaarplaatsen monsters kaas te verzamelen.

Hieronder volgt een overzicht van de gevonden aantallen propionzuurbacteriën per g in het midden der kaas.

Edammer kaas

Afkomst	Opmerkingen	Onderzocht na	Propionzuur bacteriën
Proefzuivelboerderij	Novemberkaas	4 mnd	5
„	Decemberkaas	3 „	75
„	Januarikaas	2 „	100
„	Novemberkaas	6 dagen	200
	uit denzelfden bak	23 „	100
	„ „ „	6 weken	40
	„ „ „	3 mnd	20
	„ „ „	5 „	5
Fabriek in N. Holland	kaas met gebreken	—	14 000 000
Dezelfde fabriek	—	4 dagen	1 500
„ „	—	16 „	120 000
Fabriek in Friesland	gepasteuriseerde melk	—	450
Dezelfde fabriek	„ „	—	170
Fabriek in Friesland	20 + gepast. melk	4 weken	800

Fabriekskaas in Goudsch model

Afkomst	Opmerkingen	Onderzocht na	Propionzuur bacteriën
Zuid-Holland	—	—	0
Dezelfde fabriek	—	—	20
Friesland	40 + gepast. melk	5 weken	60
„	40 + rauwe „	4 „	80
„	40 + gepast. „	4 „	100
„	20 + gepast. „	4 „	300
„	20 + rauwe „	4 „	400
„	40 + rauwe „	5 „	750
„	40 + rauwe „	4 „	1 000
„	40 + rauwe „	5 „	1 000
„	40 + rauwe „	5 „	1 500
„	40 +	—	3 000
„	kaas met gebreken	—	15 000

Fransch zuivel

1 kaas, bereid van gepasteuriseerde melk, met 25 propionzuurbacteriën.

Broodkaas

2 Friesche kazen, uit gepasteuriseerde melk 3500 propionzuurbacteriën
uit gedeeltelijk gepast. melk 50 „

Goudsche kaas van Zuidhollandsche en Utrechtsche boerderijen

Ouderdom	Aantal propionzuurbacteriën	Aantal kazen
5—12 weken	0	1
	50—100	5
	100—1 000	6
	1 000—10 000	7
	10 000—100 000	12
	100 000—1 000 000	6
	1 000 000—10 000 000	13
	10 000 000—100 000 000	4
	100 000 000—200 000 000	1

Ter vergelijking moge dienen, dat in een Emmentaler kaas 12 millioen propionzuurbacteriën per g gevonden werden.

Uit de vermelde gegevens kunnen wij dus zien, dat propionzuurbacteriën altijd in Goudsche en Edammer kazen voorkomen. Er waren slechts 2 gevallen, waarbij in 0,1 g kaas geen propionzuurbacteriën gevonden werden. Het aantal dezer bacteriën is soms klein, soms zeer hoog. Het hoogste aantal, dat wij tegenkwamen, was 180 000 000.

Het blijkt verder, dat grootere aantallen meer voorkomen in Goudsche boerderijkaas dan in Edammer kaas of in Goudsche fabriekskaas.

Men krijgt uit de cijfers niet den indruk, dat groote aantallen propionzuurbacteriën in de genoemde Nederlandsche kaassoorten beschouwd moeten worden als normaal tot de bacterieflora van deze kazen te behooren, zooals bij Emmentaler het geval is, want zelfs in de Goudsche boerderijkazen werden zeer groote verschillen in de aantallen gevonden. Het meest typische kenmerk van het onderzochte materiaal is juist de groote verscheidenheid (van 0 tot 180 000 000) in de gevonden aantallen propionzuurbacteriën.

Deze groote verscheidenheid doet dadelijk de vraag rijzen, wat hiervan de reden is. Zoekt men op deze vraag een antwoord in de literatuur, dan vindt men eigenlijk alleen de aandacht gevestigd op den invloed van het in de kaasmelk aanwezige aantal propionzuurbacteriën, dat is dus op het aantal, dat in de pas gemaakte kaas werd ingesloten. Deze verklaring nu leek ons

wel zeer onwaarschijnlijk bij de zóó frappante verschillen. Eerder was er ons inziens reden om de groote verschillen in bacterieaantal toe te schrijven aan den invloed van verschillende omstandigheden, waaronder de propionzuurbacteriën in de kaas verblijven, juist omdat de propionzuurbacteriën als lactaatvergisters zich pas later in de kaas ontwikkelen kunnen en kazen meer verschil vertoonen nà de pekeling dan daarvóór. Wij hebben dit vraagstuk met behulp van zelf gemaakte proefkazen bestudeerd.

7. Factoren, welke invloed hebben op de ontwikkeling van propionzuurbacteriën in kaas

Reeds spoedig na den aanvang van het onderzoek kregen wij een duidelijke aanwijzing, dat de omstandigheden in de kaas werkelijk van grooten invloed op de ontwikkeling van de propionzuurbacteriën zijn. Het was ons n.l. reeds lang bekend, dat kaas met hoogen pH bijna altijd nagistingsverschijnselen vertoont, waardoor een abnormaal sterke gasvorming in dergelijke kaas geconstateerd wordt. Hoewel deze nagistingen in een aantal gevallen aan boterzuur- of aan boekelscheurbacteriën moesten worden toegeschreven, werd toch veelal ook een negatief resultaat verkregen bij het onderzoek op deze twee bacteriesoorten. Er was dus reden om de mogelijkheid te veronderstellen van een gasvorming door andere bacteriën dan de genoemde. Bij een eerste oriënteerende proef, waarbij kaas gemaakt werd van in water opgeroerde wrongel, werd in de verkregen kaas, welke een hoogen pH had en ook spoedig overmatige gasvorming vertooonde, een zeer groot aantal propionzuurbacteriën gevonden. Een der kazen bevatte na 17 dagen bij een pH van 5,75 in den rand: 1 000 000 propionzuurbacteriën per g, een andere na 38 dagen bij een pH van 5,61: 4 000 000. De op hetzelfde bedrijf, de Proefzuivelboerderij, gemaakte kazen van normalen, veel lageren pH bevatten gewoonlijk slechts enkele tien- of honderdtallen van deze bacteriën per g kaas.

A. *Invloed van den pH van de kaas*

Toen reeds bij een eerste oriënteerende proef de invloed van den zuurgraad der kaas op het aantal propionzuurbacteriën bleek, is door het maken van reeksen proefkazen een nauwkeuriger onderzoek hiernaar gedaan. Verschillen in den zuurgraad der kazen werden aangebracht door meer of minder water bij de kaasbereiding te gebruiken. Na het eerste snijden der wrongel werd steeds een bepaald percentage der eerste wei afgeschept en dan een zekere hoeveelheid water aan den kaasbak toegevoegd, welke in de verschillende proeven van 5 tot 30 % uiteenliep. Om later geen oncontroleerbare veranderingen meer te krijgen, werd steeds nagewarmd met verwarmde wei, welke bij het tweede afscheppen van wei uit den kaasbak werd verkregen.

De kazen, waarvan hieronder sprake is, werden alle ongeveer 10 dagen na de bereiding bij 18° C geplaatst.

Tabel 3 geeft een overzicht van enkele series proefkazen, waaruit blijkt hoe bepalend de pH van de kaas voor het aantal propionzuurbacteriën is. De pH der kaas is zoowel voor het randdeel als voor het middendeel opgegeven. Meestal is de pH in het midden der kaas hooger dan in den rand.

TABEL 3

Aantal propionzuurbacteriën in proefkazen van verschillenden pH

Merk der proefkaas	Bereid op	Onderzocht na	pH der kaas		Propionzuurbacteriën per g
			rand	midden	
C 2	8—11 '39	36 dagen	5,08	5,17	10
O 3	8—11 '39	37 „	5,50	5,60	10 000 000
P 3	8—11 '39	37 „	5,63	5,98	50 000 000
V 5	13—12 '39	43 dagen	5,11	5,19	100
B 5	13—12 '39	43 „	5,36	5,54	6 000 000
F 5	13—12 '39	36 „	5,60	5,73	24 000 000
A 2	10—1 '40	41 dagen	5,17	5,30	2 000
T 2	10—1 '40	41 „	5,22	5,38	3 500 000
L 3	10—1 '40	41 „	5,33	5,61	6 200 000
2 O 6	6—2 '40	31 dagen	4,98	5,03	80
2 B 6	6—2 '40	32 „	5,25	5,35	100 000
N 2	6—3 '40	37 dagen	5,09	5,09	0
2 V 2	6—3 '40	38 „	5,36	5,45	200 000
3 B 4	13—6 '40	35 dagen	5,13	5,09	16 000
M 4	13—6 '40	35 „	5,32	5,26	500 000
I *a* 2	4—9 '40	61 dagen	5,25	5,28	65,000
U *a* 2	4—9 '40	62 „	5,32	5,38	140 000
L *a* 2	11—9 '40	62 dagen	5,10	5,15	150
B *a* 2	11—9 '40	62 „	5,44	5,49	2 000 000
2 F 2	18—9 '40	63 dagen	5,30	5,37	100 000
Q 2	18—9 '40	63 „	5,43	5,50	7 000 000

Daar het van belang geacht kan worden om eenig inzicht te hebben in het algemeene verband tusschen het aantal propionzuurbacteriën en den pH, is daartoe het geheele materiaal aan proefkazen verwerkt in grafieken. Dit geeft een overzichtelijker beeld dan reeksen van tabellen. Bovendien is het niet mogelijk om per kaasmaal meer dan 2 à 3 kaasseries te bereiden, zoodat het geheele proefmateriaal niet van dezelfde uitgangsmelk bereid kon worden.

Daardoor waren ook andere omstandigheden, zooals bereidingswijze, pekeling en temperatuur gedurende de eerste dagen niet volkomen gelijk, waardoor geen andere verwerking van het materiaal mogelijk is dan een statistische.

In de grafieken 1—14 geven wij het verband aan, dat gevonden werd tusschen het aantal propionzuurbacteriën in het middendeel der kaas en den pH van het randdeel en dien van het middendeel en wel op verschillenden ouderdom, n.l. voor kaas van 1, 7—8, 13—17, 20—23, 37—43, 60—68 en 79—91 dagen oud. In iedere grafiek is rechts onder het logarithmische gemiddelde van verschillende pH-gebieden voorgesteld.

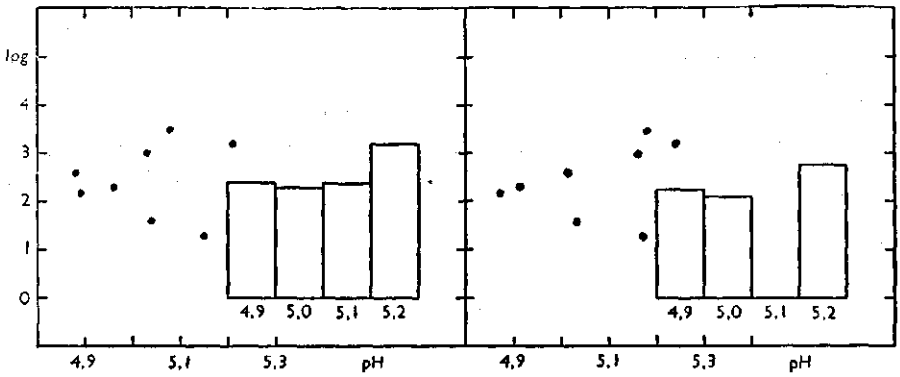

Fig. 1 en 2. Proefkazen, 1 dag oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en de pH van het randdeel (links), resp. van het middendeel (rechts) der kazen.

De rechthoeken geven de logarithmische gemiddelden der bacterie-aantallen in de pH-gebieden aan.

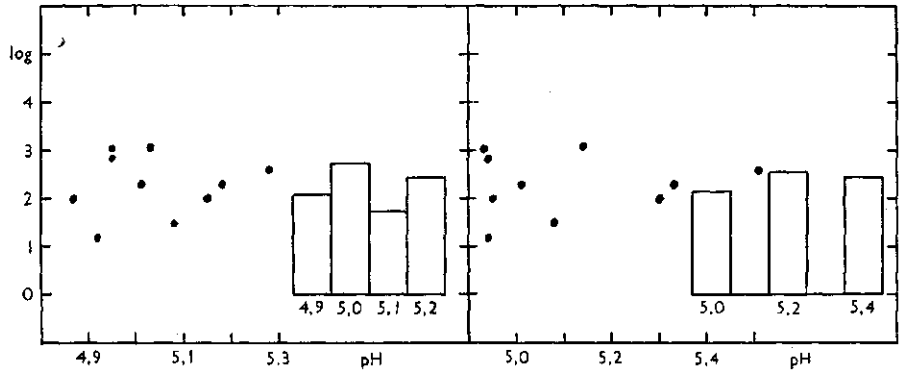

Fig. 3 en 4. *Proefkazen, 7 à 8 dagen oud*

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en de pH van het randdeel (links), resp. van het middendeel (rechts) der kazen.

De rechthoeken geven de logarithmische gemiddelden der bacterie-aantallen in de pH-gebieden aan.

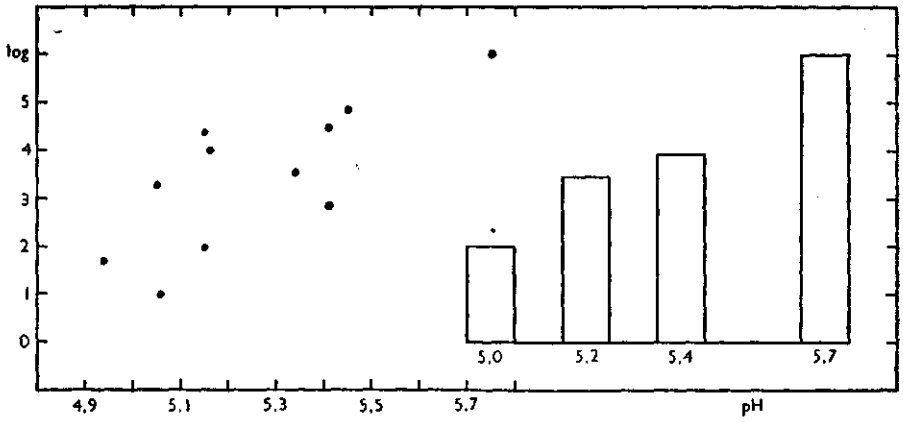

Fig. 5. Proefkazen, 13—17 dagen oud

Verband tusschen de logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en den pH van het randdeel der kazen, benevens de logarithmische gemiddelden der bacterie-aantallen in de verschillende pH-gebieden.

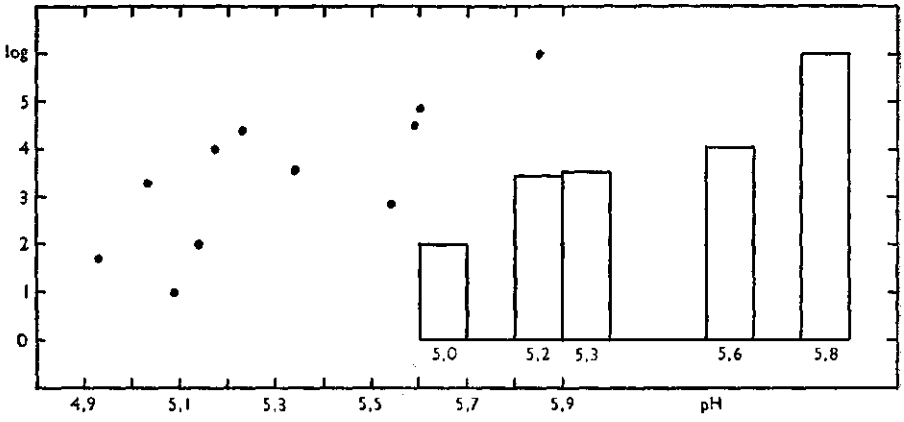

Fig. 6. Proefkazen, 13—17 dagen oud

Verband tusschen de logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en den pH van het middendeel der kazen, benevens de logarithmische gemiddelden der bacterie-aantallen in de verschillende pH-gebieden.

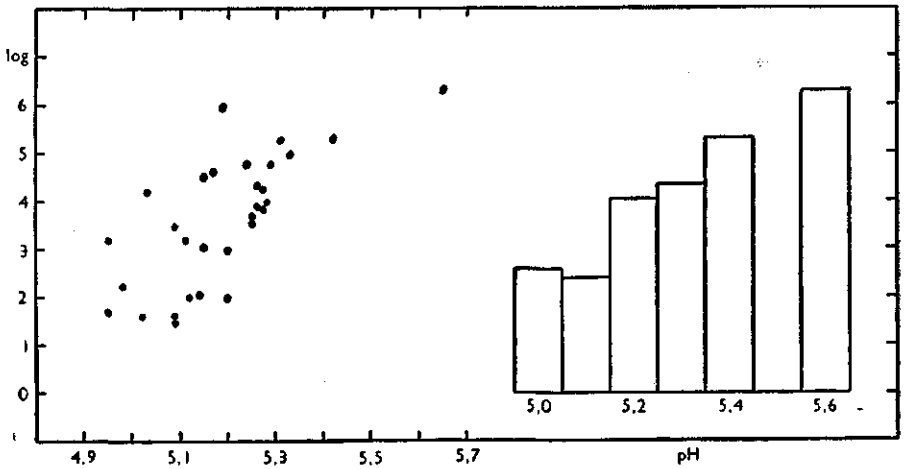

Fig. 7. Proefkazen, 20—23 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het randdeel der kazen.

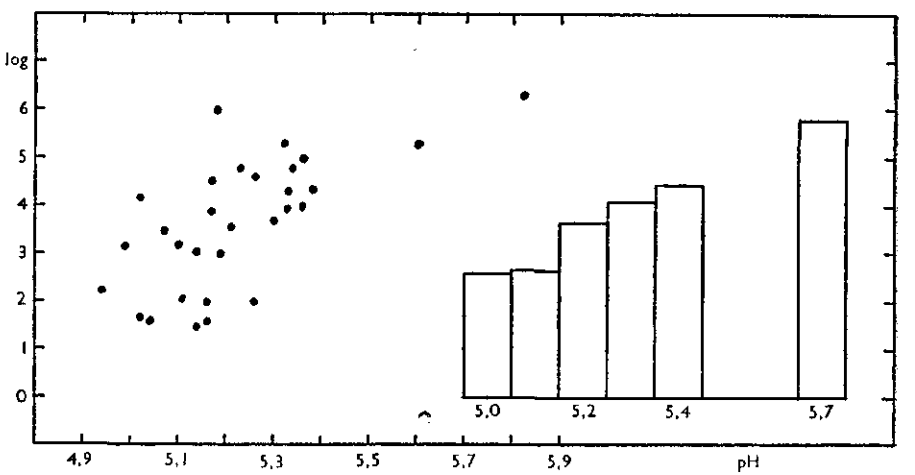

Fig. 8. Proefkazen, 20—23 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het middendeel der kazen.

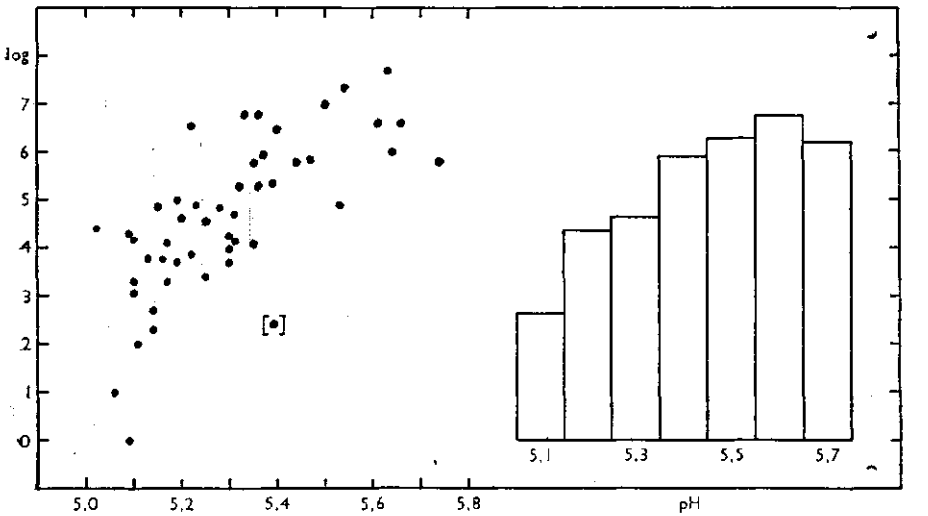

Fig. 9. Proefkazen, 37—43 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het randdeel der kazen.

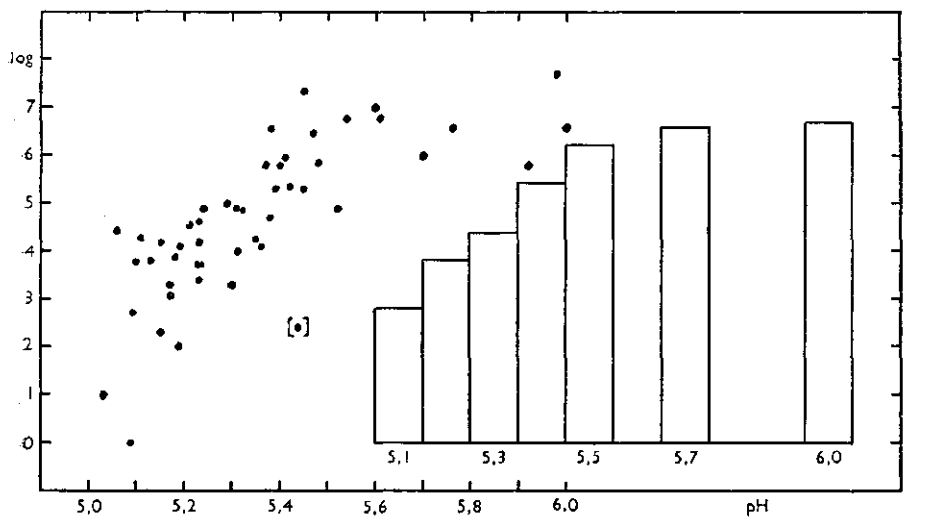

Fig. 10. Proefkazen, 37—43 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het middendeel der kazen.

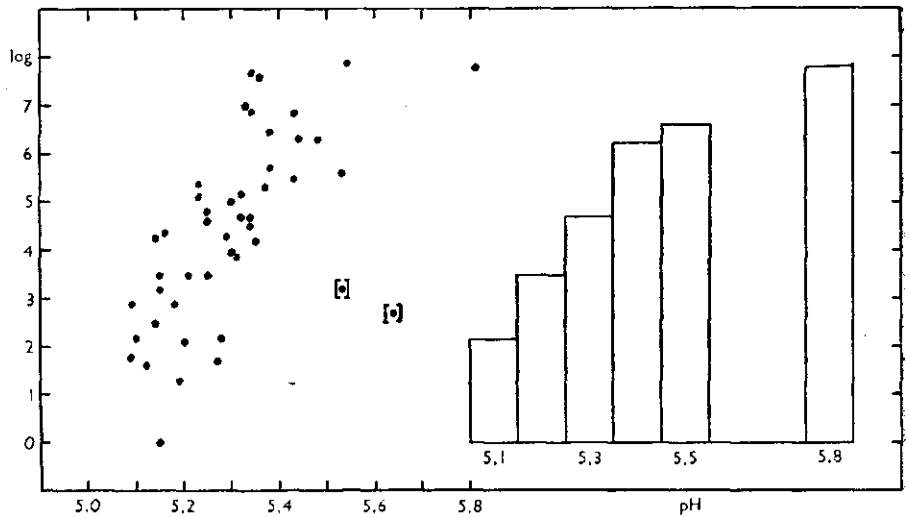

Fig. 11. Proefkazen, 60—68 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het randdeel der kazen.

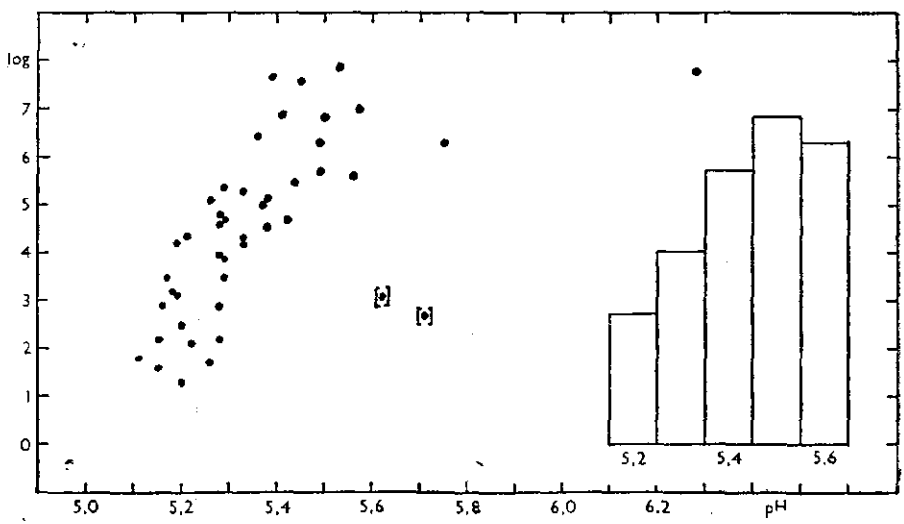

Fig. 12. Proefkazen, 60—68 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het middendeel der kazen.

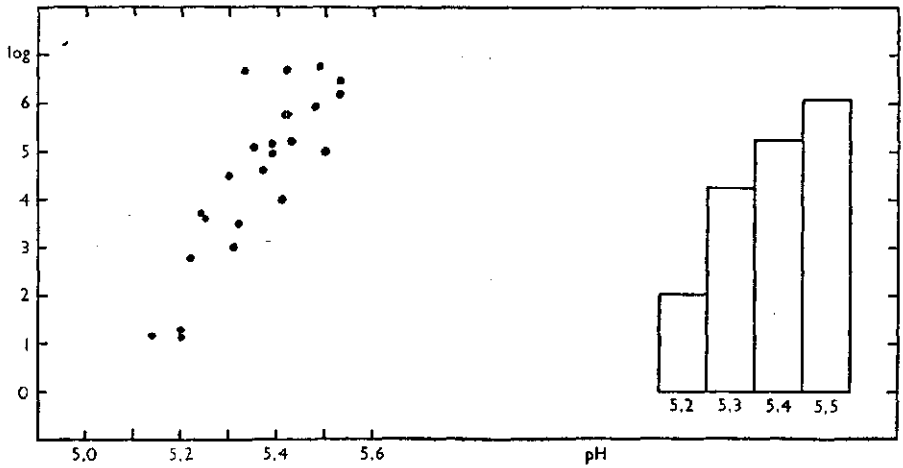

Fig. 13. Proefkazen, 79—91 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het randdeel der kazen.

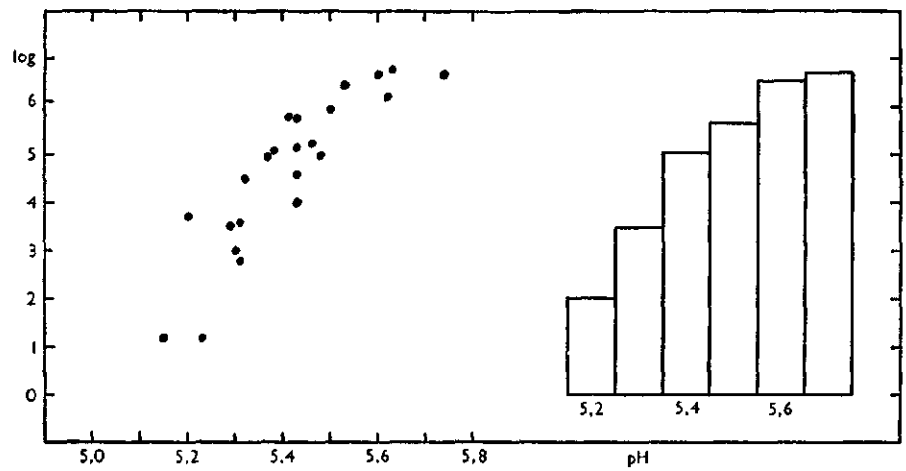

Fig. 14. Proefkazen, 79—91 dagen oud

Logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden en pH van het middendeel der kazen.

In de eerste dagen na de bereiding is het aantal propionzuurbacteriën nog onafhankelijk van den pH. Pas na 13—17 dagen begint zich een bepaalde strekking af te teekenen, terwijl deze daarna steeds duidelijker wordt. Blijkbaar begint de groei dus tusschen den 8sten en 14den dag.

Uit de gegevens zijn de logarithmische gemiddelden der bacterie-aantallen berekend. Deze zijn verzameld in de tabellen 4 en 5 en afgeleid uit het onderzoek van 175 proefkazen.

TABEL 4

Logarithmische gemiddelden voor het aantal propionzuurbacteriën in het middengedeelte van kaas van verschillenden ouderdom, bij verschillenden pH in den rand

pH rand	Aantal propionzuurbacteriën per g kaas, bij een ouderdom der kaas van						
	1 dag	7—8 dagen	13—17 dagen	20—23 dagen	37—43 dagen	60—68 dagen	79—91 dagen
4,85—4,95	250	100	—	—	—	—	—
4,95—5,05	200	550	100	400	—	—	—
5,05—5,15	250	50	—	250	500	150	—
5,15—5,25	1 600	300	3 000	12 000	24 000	3 000	100
5,25—5,35	—	—	—	23 000	44 000	51 000	18 000
5,35—5,45	—	—	8 500	200 000	800 000	1 700 000	180 000
5,45—5,55	—	—	—	—	1 900 000	3 900 000	1 200 000
5,55—5,65	—	—	—	2 000 000	5 900 000	—	—
5,65—5,75	—	—	—	—	1 600 000	—	—
5,75—5,85	—	—	—	—	—	65 000 000	—

TABEL 5

Logarithmische gemiddelden voor het aantal propionzuurbacteriën in het middengedeelte van kaas van verschillenden ouderdom bij verschillenden pH in het midden

pH midden	Aantal propionzuurbacteriën per g kaas bij een ouderdom der kaas van						
	1 dag	7—8 dagen	13—17 dagen	20—23 dagen	37—43 dagen	60—68 dagen	79—91 dagen
4,85—4,95	150	—	—	—	—	—	—
4,95—5,05	150	140	100	380	—	—	—
5,05—5,15	—	—	—	450	600	—	—
5,15—5,25	550	350	3 000	4 700	6 500	550	100
5,25—5,35	—	—	3 500	12 500	24 000	11 000	3 000
5,35—5,45	—	280	—	28 000	265 000	550 000	112 000
5,45—5,55	—	—	—	—	1 700 000	7 300 000	460 000
5,55—5,65	—	—	11 500	—	—	2 000 000	3 600 000
5,65—5,75	—	—	—	630 000	4 000 000	—	5 000 000

De tabellen 4 en 5 geven dus het verband tusschen het aantal propionzuurbacteriën, dat op een bepaald tijdstip in de kaas aanwezig is en den pH van rand-, resp. middendeel der kaas *op datzelfde tijdstip*.

Het kon echter ook van groot belang geacht worden om te weten in hoeverre het aantal propionzuurbacteriën op een bepaald oogenblik afhankelijk is van den pH in een jonger stadium der kaas. Zou een dergelijk verband bestaan, dan is het n.l. mogelijk om reeds bij jonge kazen te voorspellen hoeveel propionzuurbacteriën bij een bepaalden ouderdom dezer kazen aanwezig zullen zijn.

De pH blijft in een kaas echter niet constant. De laagste pH in een kaas vindt men direct na de volledige omzetting van de melksuiker; daarna heeft een stijging plaats, die met de rijping voortschrijdt. Behalve hierdoor wordt de pH-stijging ook beïnvloed door eventueele nagistingen. Een sterkere pH-stijging dan normaal treffen we bijv. aan bij boterzuurgisting.

Bij de door ons op propionzuurbacteriën onderzochte kazen kregen wij een gemiddeld pH-verloop, zooals in tabel 6 en in fig. 15 wordt aangegeven. In tabel 6 is tevens aangegeven hoeveel propionzuurbacteriën men ongeveer verwachten kan bij een bepaalden ouderdom der kaas bij een zekeren pH op een ander tijdstip. Zeer nauwkeurig is deze tabel niet, omdat zij de uitkomst is van zoowel pH- als bacteriënaantallen-gemiddelden, maar zij geeft toch een zekeren indruk.

TABEL 6

Gemiddeld pH-verloop in de proefkazen en het daaruit met behulp van tabel 5 berekende aantal propionzuurbacteriën

	pH en aantal propionzuurbacteriën in het midden der kaas na					
	1 dag	7—8 dagen	20—23 dagen	37—43 dagen	60—68 dagen	79—91 dagen
pH	—4,90	—4,99	—5,09	—5,18	—5,25	—5,31
bact.	0—150	0—140	0—400	0—600	0—550	0—3 000
pH	4,90—5,00	4,99—5,08	5,09—5,19	5,18—5,28	5,25—5,35	5,31—5,41
bact.	—150	—140	450—4 000	5 000—20 000	550—500 000	—100 000
pH	5,00—5,10	5,08—5,22	5,19—5,32	5,28—5,42	5,35—5,49	5,41—5,53
bact.	—150	—350	4 000—12 000	25 000—250 000	500 000	—500 000
pH	5,10—	5,22—	5,32—	5,42—	5,49—	5,53—
bact.	—550	—350	12 000—20 000	1 000 000	7 000 000	4 000 000

Uit de proefreeksen is het verband tusschen pH der kaas en het aantal propionzuurbacteriën op een later tijdstip ook direct bepaald. Om groote

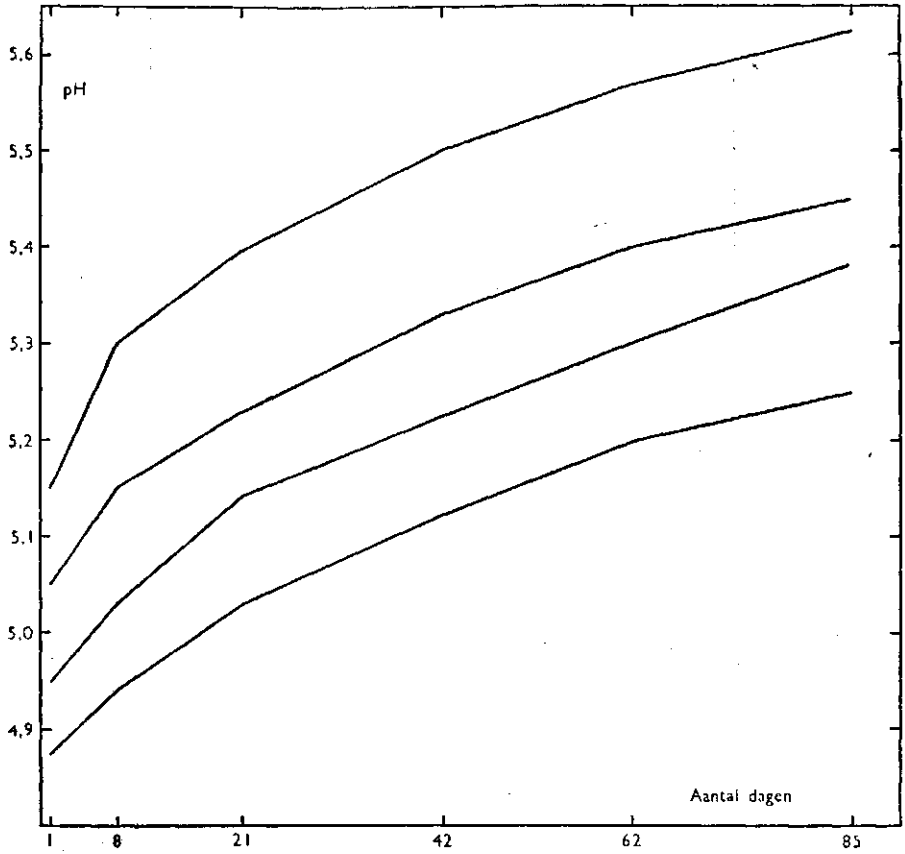

Fig. 15

Gemiddeld verloop van den pH in het middendeel der proefkazen met den tijd.

tabellen te vermijden geven wij de resultaten in de grafieken 16—21 weer. Ook uit deze grafieken kan men de afhankelijkheid van het aantal propionzuurbacteriën van den pH aflezen. Om een overzichtelijk beeld te krijgen willen wij het aldus geconstateerde verband ook nog in den vorm van enkele tabellen geven. Deze tabellen 7, 8 en 9 geven de bij onze proefkazen gevonden gemiddelde waarden. Men hoede er zich voor een te groote beteekenis aan de opgesomde getallen te hechten. Zij dienen slechts om een indruk te geven, daar de spreiding uit den aard der zaak vrij groot is. Deze tabellen geven een beeld, dat weinig van dat in tabel 6 verschilt.

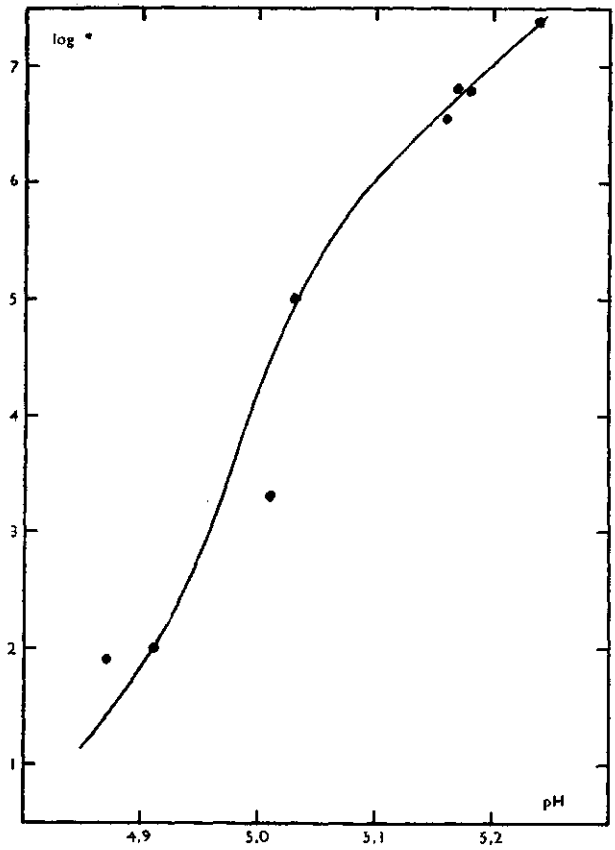

Fig. 16

Verband tusschen den pH van het middendeel der proefkazen, gemeten na 1 dag en de logarithme van het aantal propionzuurbacteriën, hetwelk na 5—6 weken in het midden der kazen gevonden werd.

TABEL 7

Ontwikkeling van propionzuurbacteriën in kazen, welke 1 dag na de bereiding verschillenden pH hadden

pH in het midden der kaas na 1 dag	Aantal propionzuurbacteriën na 5—6 weken
4,90	100
4,95	500
5,00	17 000
5,05	250 000
5,10	1 000 000
5,15	3 000 000
5,20	10 000 000

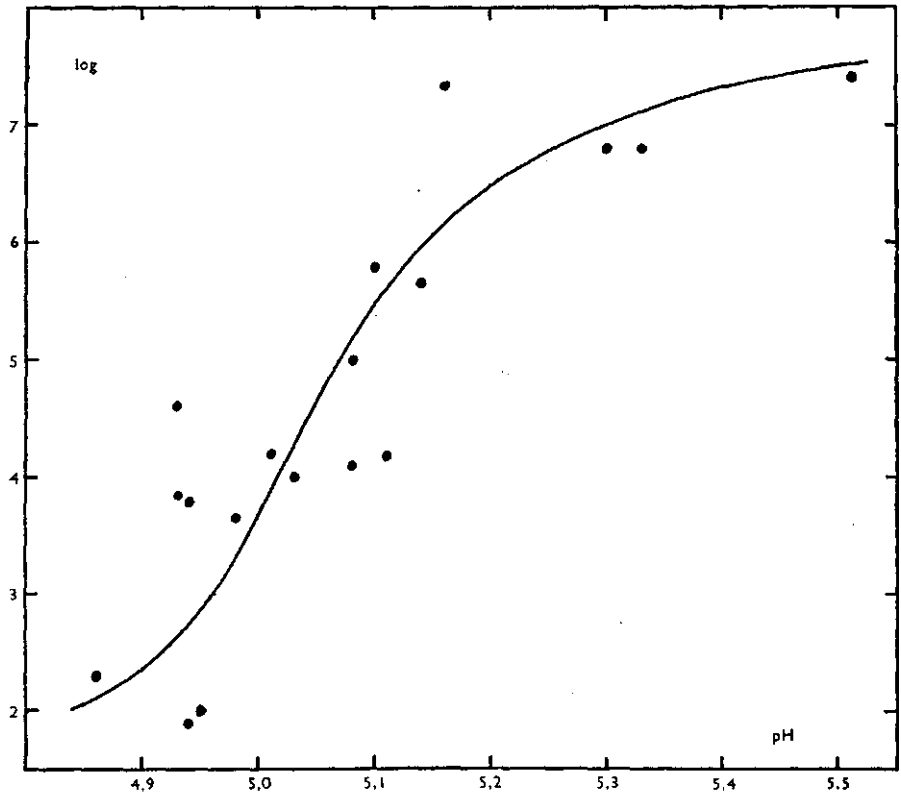

Fig. 17

Verband tusschen den pH van het middendeel der proefkazen, gemeten na 6—8 dagen en de logarithme van het aantal propionzuurbacteriën, hetwelk na 5—6 weken in het midden der kazen gevonden werd.

TABEL 8

Ontwikkeling van propionzuurbacteriën in kazen, welke 6—8 dagen na de bereiding verschillenden pH hadden

pH in het midden der kaas na 6—8 dagen	Aantal propionzuurbacteriën na 5—6 weken
4,90	250
4,95	600
5,00	5 000
5,05	40 000
5,10	300 000
5,15	1 000 000
5,20	3 000 000
5,30	6 000 000

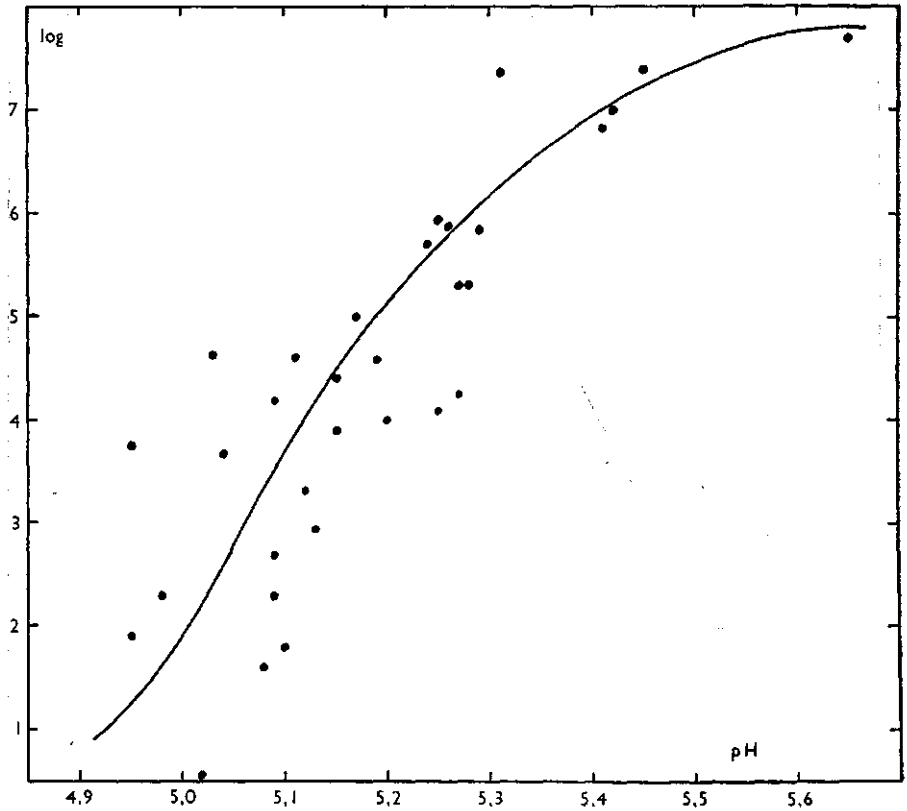

Fig. 18

Verband tusschen den pH van het randdeel der proefkazen na 3 weken en het aantal propionzuurbacteriën in het midden der kazen na 5 à 6 weken.

TABEL 9

Ontwikkeling van propionzuurbacteriën in kazen, welke ongeveer 3 weken na de bereiding verschillenden pH hadden

pH in het midden der kaas na 3 weken	Aantal propionzuurbacteriën na	
	5—6 weken	9 weken
4,95	10	30
5,00	50	200
5,05	300	800
5,10	2 000	5 000
5,15	10 000	30 000
5,20	40 000	200 000
5,25	200 000	400 000
5,30	600 000	1 000 000
5,40	4 000 000	8 000 000
5,50	20 000 000	40 000 000

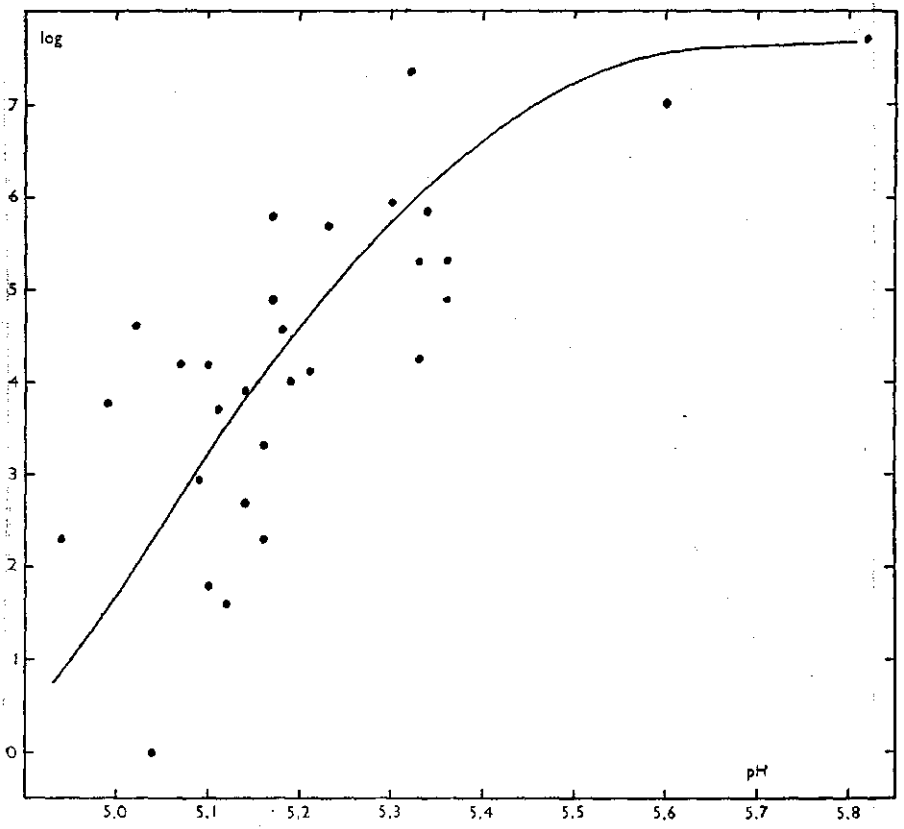

Fig. 19

Verband tusschen den pH van het middendeel der proefkazen na 3 weken en het aantal propionzuurbacteriën in het midden der kazen na 5 à 6 weken.

We kunnen deze resultaten van het onderzoek als volgt in woorden uitdrukken.

Indien 24 uur na de bereiding de kaas een pH heeft lager dan 5,0, zal geen of slechts uiterst geringe groei van propionzuurbacteriën optreden; is de pH 5,0 à 5,1, dan is matige groei te verwachten; is de pH hooger dan 5,1, dan zal in ieder geval zeer sterke groei volgen.

Indien 6—8 dagen na de bereiding van de kaas deze in het middendeel een pH heeft lager dan 5,0, zal nauwelijks groei van propionzuurbacteriën optreden; is de pH 5,0 à 5,1, dan zal de groei meestal tot een totaal van eenige tienduizenden beperkt blijven; is de pH boven 5,15, dan zal de groei zeer sterk zijn.

Indien 3 weken na de bereiding van de kaas de pH in het middendeel

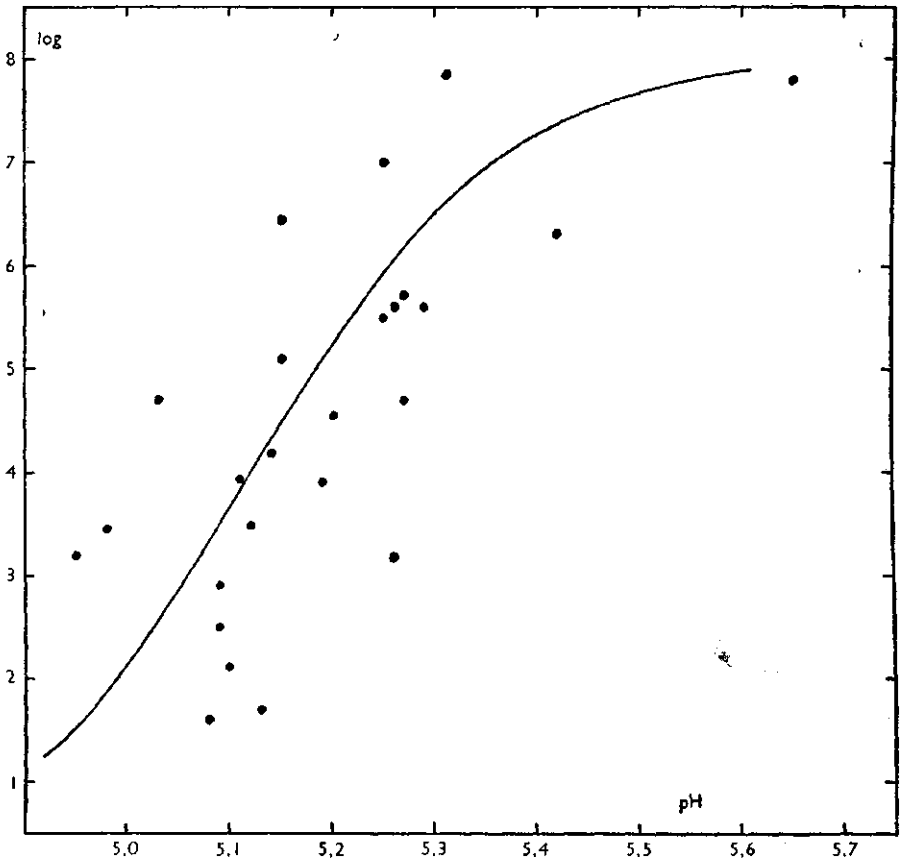

Fig. 20

Verband tusschen den pH van het randdeel der proefkazen na 3 weken en het aantal propionzuurbacteriën in het midden der kazen na 9 weken.

lager is dan 5,1, dan blijft de groei der propionzuurbacteriën zeer beperkt; is de pH 5,1 à 5,2, dan zal het aantal dezer bacteriën meestal niet boven enkele tienduizenden stijgen; is de pH 5,2 à 5,3, dan komt men tot een maximum van enkele honderdduizenden en is de pH boven 5,3, dan zijn millioenen te verwachten.

Voor de ontwikkelingsmogelijkheid van propionzuurbacteriën in kaas is de pH dus, zooals uit het voorgaande blijkt, van zeer veel belang. Niet alleen zien wij een verband tusschen den pH van de kaas en het aantal propionzuurbacteriën, maar het is zelfs mogelijk om reeds uit den pH van kaas in een jong stadium te voorspellen hoe de ontwikkeling der propionzuurbacteriën later verloopen zal.

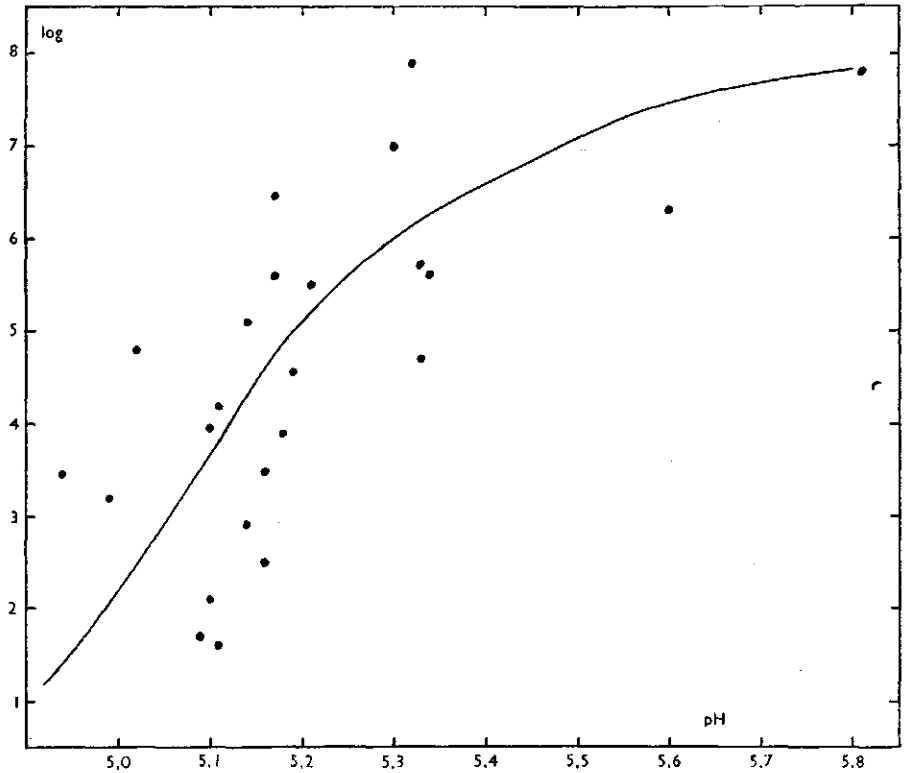

Fig. 21

Verband tusschen den pH van het middendeel der proefkazen na 3 weken en het aantal propionzuurbacteriën in het midden der kazen na 9 weken.

Bovendien geeft het verkregen resultaat de verklaring van het feit, waarom, in het algemeen gesproken, het aantal propionzuurbacteriën in Goudsche boerenkaas hooger is dan in Goudsche fabriekskaas of Edammer kaas. De Goudsche boerenkaas heeft n.l. meestal een hoogeren pH, omdat bij de bereiding van deze kaas dikwijls veel water in den kaasbak wordt toegevoegd.

B. *Invloed van het zoutgehalte der kaas*

Onder de factoren, welke van invloed zijn op de ontwikkeling van bacteriën, moet ook het zoutgehalte van het milieu genoemd worden. Bij kaas, waarvan de gunstige zoutconcentratie bij ongeveer 5 % ligt (berekend als het zoutgehalte van het kaasvocht), kunnen daarom ook kwantitatieve verschillen in de bacteriënflora verwacht worden als gevolg van verschillen in het zoutgehalte. Ook in één kaas bestaan plaatselijke verschillen in de zoutconcentratie.

Deze is in den rand altijd hooger dan in het middendeel, waardoor de bacteriologische toestand verschillen vertoont.

Onderzoeken we rand- en middendeel van kazen op het aanwezige aantal propionzuurbacteriën, dan vinden we ook verschillen, gelijk uit tabel 10 blijkt.

TABEL 10

Aantal propionzuurbacteriën in het randdeel en in het middendeel van kaas

Kaas n°.	Ouderdom in dagen	Randdeel			Middendeel		
		propionzuur-bacteriën	pH	% zout op vocht	% zout op vocht	pH	propionzuur-bacteriën
Y B 1	21	15	5,09	5,46	4,02	5,14	30
Y B 2	48	100	5,11	6,62	6,55	5,18	500
Y B 3	64	100	5,18	6,96	6,91	5,28	800
X B 1	23	700	5,27	4,82	4,56	5,33	20 000
X B 2	41	14 000	5,32	4,63	4,22	5,39	200 000
X B 3	64	28 000	5,38	5,19	4,92	5,49	500 000
Z B 1	22	7 000	5,29	4,11	3,72	5,34	60 000
Z B 2	40	115 000	5,47	4,44	3,99	5,48	700 000
Z B 3	65	11 500	5,53	5,24	4,99	5,56	400 000

De gevonden verschillen mogen niet altijd geheel aan het zoutgehalteverschil worden toegeschreven, daar ook dikwijls de pH van rand- en middendeel ongelijk is. Doch de verschillen in aantallen propionzuurbacteriën in tabel 10 zijn te groot om alleen aan de pH-verschillen te wijten.

Bij onderzoek van de gegevens, welke aan 92 proefkazen ontleend werden, kon geen afhankelijkheid van het aantal propionzuurbacteriën van het zoutgehalte geconstateerd worden als deze gegevens ingedeeld werden in groepen van ongeveer gelijken pH. Bij deze proefkazen, die alle een ongeveer normaal zoutgehalte hadden, was in het betrekkelijk enge traject der zoutconcentraties de spreiding in het aantal propionzuurbacteriën bij deze kazen, die onder verschillende omstandigheden bereid waren, te groot om een verband te kunnen constateeren.

Daarom zijn eenige proeven genomen om onder zoo gelijk mogelijke omstandigheden te kunnen nagaan of het zoutgehalte invloed heeft op de ontwikkeling van propionzuurbacteriën. Voor dit doel werd eenige malen proefkaas gemaakt. De kazen van elk kaasmaal, die dus alle gelijk waren, werden in 3 groepen verdeeld en deze 3 groepen werden gedurende verschillend langen tijd gepekeld. Bij de verschillende kaasmalen werd de watertoevoeging zóó geregeld, dat de kaas iederen keer op een anderen pH werd gemaakt, zoodat we een indruk konden krijgen van den invloed van het zoutgehalte bij verschillenden pH.

In tabel 11 geven wij een overzicht van deze proeven (waarbij alle gegevens het middendeel der onderzochte kazen betreffen) voor de kazen bij een ouderdom van ruim 3 weken, in tabel 12 voor een van ongeveer 7 weken en in tabel 13 voor een van ruim 9 weken.

TABEL 11

Propionzuurbacteriën in kazen van verschillend zoutgehalte na ongeveer 3 weken

Kaas n°.	Water bij de bereiding	Gepekeld gedurende	Onderzocht na	pH	% zout op vocht	Propionzuurbacteriën
U A 1	5 %	1 dag	27 dagen	5,09	3,15	90
U B 1		2 dagen	27 „	5,10	4,85	80
U C 1		3 „	28 „	5,12	5,86	150
Y A 1	10 %	1 dag	22 dagen	5,16	2,91	100
Y B 1		2 dagen	21 „	5,14	4,02	30
Y C 1		3 „	22 „	5,16	5,50	40
Z A 1	30 %	1 dag	22 dagen	5,36	2,09	100 000
Z B 1		2 dagen	22 „	5,34	3,72	60 000
Z C 1		3 „	22 „	5,38	3,73	23 000

TABEL 12

Propionzuurbacteriën in kazen van verschillend zoutgehalte na ongeveer 7 weken

Kaas n°.	Water bij de bereiding	Gepekeld gedurende	Onderzocht na	pH	% zout op vocht	Propionzuurbacteriën
U A 2	5 %	1 dag	47 dagen	5,23	3,88	900
U B 2		2 dagen	47 „	5,12	6,05	65
U C 2		3 „	48 „	5,12	7,00	40
Y A 2	10 %	1 dag	46 dagen	5,27	2,74	3 100
Y B 2		2 dagen	48 „	5,18	6,55	500
Y C 2		3 „	48 „	5,23	6,82	200
X A 2	20 %	1 dag	42 dagen	5,37	2,62	900 000
X B 2		2 dagen	41 „	5,32	4,22	200 000
X C 2		3 „	42 „	5,30	5,35	18 000

TABEL 13

Propionzuurbacteriën in kazen van verschillend zoutgehalte na ongeveer 9 weken

Kaas n°.	Water bij de bereiding	Gepekeld gedurende	Onderzocht na	pH	% zout op vocht	Propionzuurbacteriën
U A 3	5 %	1 dag	65 dagen	5,26	4,55	50
U B 3		2 dagen	65 „	5,22	6,17	130
U C 3		3 „	66 „	5,15	8,00	40
Y A 3	10 %	1 dag	65 dagen	5,29	4,85	3 000
Y B 3		2 dagen	64 „	5,28	6,91	800
Y C 3		3 „	66 „	5,20	7,94	300
X A 3	20 %	1 dag	63 dagen	5,57	3,20	10 000 000
X B 3		2 dagen	64 „	5,49	4,92	500 000
X C 3		3 „	64 „	5,42	6,34	50 000

De zoutconcentratie heeft bij de lagere pH-waarden geen invloed, omdat dan toch geen of weinig groei optreedt. Bij hoogere pH-waarden, waar wel een flinke groei van propionzuurbacteriën kan plaats vinden, is de zoutfactor niet te verwaarloozen, doch pas goed te bemerken als de verschillen enkele procenten bedragen. We kunnen dus wel zeggen, dat de invloed van het zoutgehalte van de kaas op de ontwikkeling der propionzuurbacteriën zeer veel geringer is dan die van den pH.

C. *Invloed van het vochtgehalte van de kaas*

Het is mogelijk, dat het watergehalte van de kaas eenigen invloed heeft op den bacteriegroei. Wilden wij proeven nemen om den invloed van het watergehalte na te gaan, dan moest gezorgd worden dat van de met verschillend vochtgehalte te bereiden kazen de pH en het zoutgehalte gelijk waren.

Aan deze voorwaarden hebben wij ondanks vele pogingen niet ten volle kunnen voldoen. Daarom is uit het proefmateriaal een keuze gemaakt van die gevallen, waarin bij parallelkazen de meeste overeenstemming tusschen pH en zoutgehalte bestond. Zie hiervoor tabel 14.

Om van 2 parallelkazen het vochtgehalte verschillend te krijgen bij gelijken pH, werd in den eenen kaasbak meer water toegevoegd dan in den anderen en de kaas in dien eenen bak minder droog afgewerkt. Daartoe werd de wrongel in dezen bak ook op minder hooge temperatuur nagewarmd dan in den anderen.

TABEL 14

Propionzuurbacteriën in kazen van verschillend vochtgehalte

Kaas n°.	Bereid op	% water	Onderzocht na	pH midden	% zout op vocht	Vocht %	Propion-zuur-bacteriën
Y 1	13-8 '40	30	22 dagen	5,21	3,55	47,6	3 500
C 1	id.	20	idem	5,19	3,32	47,0	1 000
Z 1	21-8 '40	20	21 dagen	5,02	3,74	51,7	16 000
E 1	id.	10	idem	4,99	3,72	48,8	1 500
V 1	4-12 '40	30	40 dagen	5,15	4,17	46,6	15 000
D 1	id.	15	idem	5,13	3,88	45,8	6 000
T 2	7-8 '40	25	41 dagen	5,24	4,97	45,9	80 000
H 2	id.	15	idem	5,21	4,61	45,3	37 000
Y 2	13-8 '40	30	42 dagen	5,36	4,40	48,0	13 000
C 2	id.	20	idem	5,31	4,00	45,2	10 000
S 1	11-12 '40	40	40 dagen	5,29	4,24	46,9	100 000
H 1	id.	20	idem	5,31	3,77	43,2	75 000
V 2	4-12 '40	30	61 dagen	5,21	3,69	46,1	23 000
D 2	id.	15	idem	5,19	3,67	44,1	17 000

Uit de tabel blijkt werkelijk van eenig verschil. De droger bereide kazen hebben een geringer aantal propionzuurbacteriën, doch gemiddeld is het verschil van weinig belang.

D. *Invloed van de bewaringstemperatuur*

Daar het temperatuuroptimum der propionzuurbacteriën boven 25° C ligt, kunnen we verwachten, dat de bewaringstemperatuur op de ontwikkeling dezer bacteriën van invloed is. Hoe hooger deze temperatuur is, des te sneller zal de groei zijn en is er ook kans op een hooger maximum bereikt aantal bacteriën.

Om iets meer van den temperatuurinvloed te weten te komen, hebben wij van eenige bakken kaas de helft van heta antal (gemerkt a) bij 18° C bewaard en de andere helft (gemerkt b) bij 22° C.

Zooals men uit tabel 15 ziet, is de groei van propionzuurbacteriën in de bij de hooge temperatuur van 22° C bewaarde kazen zeer veel sterker dan in die, welke bij 18° C bewaard werden. Dit geldt natuurlijk niet voor die

kazen, waarin de pH zóó laag was, dat geen groei kon plaats vinden (kazen gemerkt L).

TABEL 15

Invloed van de temperatuur op den groei van propionzuurbacteriën in kaas

Ouderdom van de kaas	18° C			22° C		
	Kaas n°.	pH midden	Propionzuurbacteriën	Propionzuurbacteriën	pH midden	Kaas n°.
42 dagen	L *a* 1	5,06	27 000	1 600	5,20	L *b* 1
62 „	L *a* 2	—	150	2 500	—	L *b* 2
82 „	L *a* 3	5,15	15	0	5,21	L *b* 3
41 dagen	V *a* 1	5,09	500	120 000	5,20	V *b* 1
61 „	V *a* 2	5,29	240 000	3 400 000	5,31	V *b* 2
82 „	V *a* 3	—	10 000	6 500	—	V *b* 3
42 dagen	U *a* 1	—	13 000	17 000 000	—	U *b* 1
62 „	U *a* 2	—	140 000	12 000 000	—	U *b* 2
82 „	U *a* 3	5,37	90 000	500 000	5,45	U *b* 3
42 dagen	D *a* 1	5,23	5 000	19 000 000	5,26	D *b* 1
62 „	D *a* 2	—	40 000	12 000 000	—	D *b* 2
83 „	D *a* 3	5,38	120 000	1 800 000	5,39	D *b* 3
41 dagen	B *a* 1	5,38	50 000	55 000 000	5,47	B *b* 1
62 „	B *a* 2	—	2 000 000	17 000 000	—	B *b* 2
82 „	B *a* 3	5,62	1 600 000	8 000 000	5,63	B *b* 3

Ook blijkt uit de tabel, dat bij de hooge temperatuur het maximum aantal bacteriën, hetwelk tijdens de bewaring in de kaas gevonden werd, eerder bereikt is, vooral als een wat hooge pH een onbelemmerden groei mogelijk maakt (kazen, gemerkt U, D en B).

Bij de hoogere bewaringstemperatuur geschiedt het oploopen van den pH der kaas in het algemeen iets sneller (zie bijv. de kazen, gemerkt L 1, V 1 en B 1). Wij hebben wel dikwijls den indruk gekregen, dat een sterke groei van propionzuurbacteriën gepaard gaat met een pH-stijging, doch of de pH-stijging een gevolg van dezen groei is, of dat omgekeerd de propionzuurbacteriëngroei mogelijk werd door de pH-stijging (de kaas rijpt n.l. bij hoogere temperatuur sneller), kon uit de analyses niet afgeleid worden.

E. *Invloed van het beginaantal bacteriën*

In een vasten voedingsbodem als kaas, waarin, vooral voor bacteriën, waarvan de groei in een later stadium optreedt, deze als koloniën zullen uit-

groeien, zal ongetwijfeld het aantal in de kaas ontwikkelde bacteriën ook afhankelijk zijn van het beginaantal. Wij hebben een aantal kaasreeksen gefabriceerd, telkens twee uit dezelfde melk, waarvan de eene zwaar geënt werd met propionzuurbacteriën, de andere daarentegen ongeënt bleef. Onafhankelijk van den pH kregen wij toch in alle kazen eenigen groei, zoodat zelfs nog na 61 dagen in de geënte kazen van lagen pH millioenen propionzuurbacteriën aanwezig waren. We zien uit tabel 16, dat bij zoodanig zware entingen van de kaasmelk het aantal in de kaas gevonden propionzuurbacteriën zelfs niet meer van den pH afhankelijk is. In deze proeven werd de kaasbakmelk geënt met 0,1 of 0,01 % vloeistofcultuur, die per ml ongeveer 500 000 000 tot 1 000 000 000 propionzuurbacteriën bevatte.

TABEL 16

Aantal propionzuurbacteriën in kaas van 61 dagen, bereid uit melk, welke niet en welke met zeer veel bacteriën geënt was

Ongeënt			Zwaar geënt		
pH midden	Aantal propionzuurbacteriën		pH midden	Aantal propionzuurbacteriën	
	na 5 dagen	na 61 dagen		na 5 dagen	na 61 dagen
5,17	40	3 000	5,19	20 000 000	295 000 000
5,33	10	15 000	5,22	50 000 000	30 000 000
5,26	15	130 000	5,29	9 000 000	130 000 000
5,28	20	9 000	5,34	7 500 000	200 000 000
5,33	50	200 000	5,33	14 000 000	120 000 000
5,53	360	75 000 000	5,52	10 000 000	200 000 000

Bij een proef met enting van slechts 0,0002 % cultuur in de kaasbakmelk waarbij per g kaas nog ongeveer 20 000 bacteriën geënt werden, vonden wij na 40 dagen in de ongeënte kaas bij een rand-pH van 5,10 20 000 propionzuurbacteriën per g en in de geënte 5 000 000.

Blijkens de aantallen propionzuurbacteriën, welke wij in jonge kaas, vóórdat groei dezer bacteriën kon zijn opgetreden, vonden, kan de kaasmelk verschillende aantallen propionzuurbacteriën bevatten. In 19 gevallen dat wij binnen 8 dagen het aantal propionzuurbacteriën in kaas, bereid uit melk van de Proefzuivelboerderij, bepaalden, was dit aantal

in 8 gevallen beneden 50,
in 13 gevallen beneden 200 en
in 16 gevallen beneden 1000,

terwijl slechts 2 gevallen met 1100 en 1 geval met 3000 voorkwamen. Deze verschillen zijn zóó gering, dat hiervan weinig invloed te verwachten is.

Slechts bij gevallen van ernstige besmetting der melk met propionzuurbacteriën zou van een invloed van het beginaantal kunnen blijken.

F. *Invloed van den tijd*

Daar de propionzuurbacteriën in de kaas een betrekkelijk langzamen groei vertoonen, zal het aantal op een bepaald moment aanwezige bacteriën ook afhangen van den ouderdom van de kaas. Reeds uit de gegevens over kazen van verschillenden pH, waarbij het materiaal naar den ouderdom der kazen gesplitst was, kan afgeleid worden, dat na ongeveer 20 dagen de groei der bacteriën nog in vollen gang is. Het maximum-aantal wordt meestal pas na ongeveer 2 maanden bereikt en dit geldt voor gevallen, waarin matige groei optreedt, zoowel als voor gevallen, waarin sterke groei plaats vindt. In fig. 22

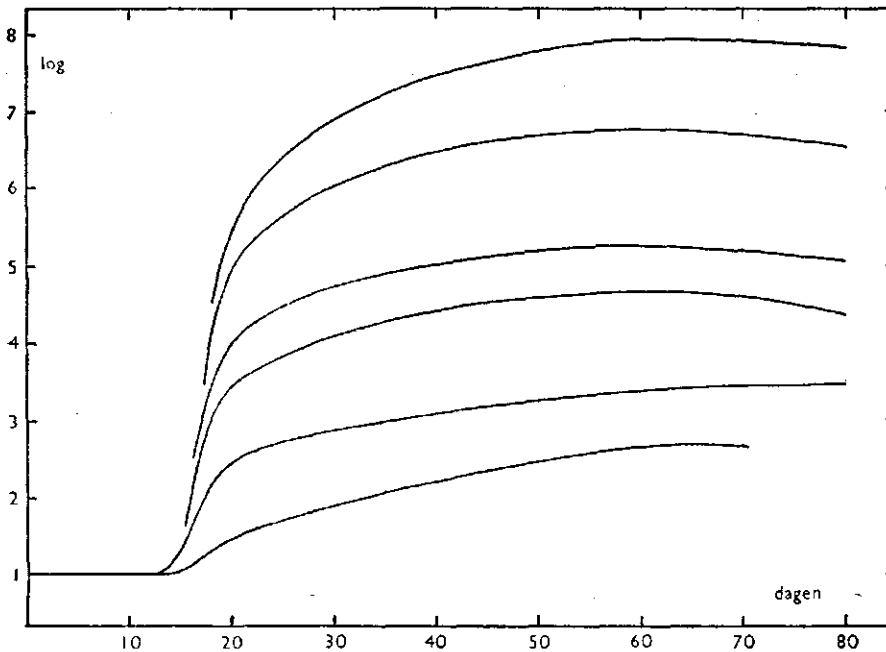

Fig. 22

Groei van propionzuurbacteriën in kaas in verschillende gevallen van meer of minder sterke ontwikkelingsmogelijkheid.

zijn enkele groeilijnen geteekend voor gevallen van verschillend sterken groei, zooals die gemiddeld bij onze proeven geconstateerd werden. Deze gemiddelden zijn eveneens in tabel 17 opgegeven. Zij geven een denkbeeld van de groei-

snelheid in kazen, waarin weinig tot zeer sterke groei optreedt. (Zooals wij vroeger zagen, wordt deze meer of minder sterke groei hoofdzakelijk bepaald door den pH).

TABEL 17

Groei van propionzuurbacteriën in kaas, waarin door pH-verschillen meer of minder sterke groei mogelijk was

Kaas van	Aantal propionzuurbacteriën					
8 dagen	10	10	10	10	10	10
20 „	30	300	3 000	10 000	100 000	300 000
40 „	150	1 250	25 000	100 000	3 000 000	30 000 000
60 „	500	2 000	50 000	200 000	6 000 000	40 000 000
80 „	500	4 000	20 000	150 000	3 000 000	30 000 000

Na het bereiken van het maximum volgt meestal weer een geringe daling. Wij zagen echter bij de bespreking van den invloed van de temperatuur, dat bij hooge temperatuur het maximum eerder bereikt wordt en daarna een snellere daling volgt. De cijfers van tabel 17 betreffen een bewaringstemperatuur van ongeveer 18° C.

G. *Conclusie*

Uit de in dit hoofdstuk besproken onderzoekingen volgt, dat voor den groei van propionzuurbacteriën in kaas de pH de belangrijkste factor is. In kaas van hoogen pH zal een sterke groei optreden en in kaas van lagen pH zal de groei achterwege blijven. Het zoutgehalte van de kaas heeft ook eenigen invloed, doch deze is betrekkelijk gering. De temperatuur van bewaring van de kaas is daarentegen weer een belangrijker factor. Het aantal gevonden bacteriën wordt ook bepaald door den ouderdom van de kaas. Het watergehalte heeft waarschijnlijk slechts geringen invloed op de ontwikkeling der propionzuurbacteriën.

8. Ontwikkeling van propionzuurbacteriën in practijkkazen

Door het in het vorige hoofdstuk besprokene is het thans duidelijk geworden, om welke redenen het aantal propionzuurbacteriën, dat in kaas wordt gevonden, zoo verschillend kan zijn en, niettegenstaande het feit, dat deze bacteriën blijkbaar altijd in kaasmelk voorkomen, van 0 tot 200 millioen kan vrieeren. Deze groote verschillen moeten aan de omstandigheden, welke

de propionzuurbacteriën in kaas aantreffen, worden geweten. Naar blijkens ons onderzoek de zuurgraad van de kaas hierin het belangrijkste moment is, willen wij thans na de opsomming van de aantallen propionzuurbacteriën, welke in praktijkkazen werden gevonden (zie hoofdstuk 6), nagaan of ook bij deze kazen een verband tusschen pH en het aantal propionzuurbacteriën wordt gevonden. Om groote tabellen te vermijden, geven wij het overzicht in den vorm van 2 grafieken, waarvan de eene (fig. 23) den pH in het rand-

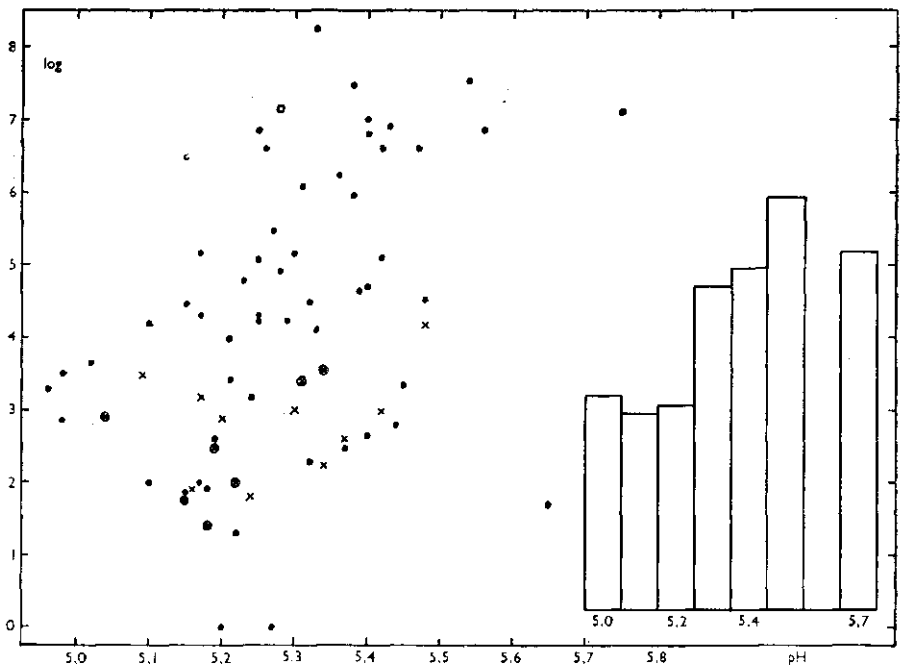

Fig. 23

pH van het randdeel en logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden bij kazen uit de practijk, alsmede logarithmische gemiddelden van de bacterieaantallen in de verschillende pH-gebieden.

. Kazen uit Utrecht en Zuid-Holland.

× Kazen uit Friesland.

⊗ Kazen uit Friesland, bereid uit gepasteuriseerde melk.

gedeelte der kaas en de andere (fig. 24) den pH in het middengedeelte met het aantal propionzuurbacteriën, dat per g kaas (in het middendeel) gevonden werd, in verband brengt. In de figuren is tevens een voorstelling gegeven van de logarithmische gemiddelden voor pH-gebieden, die 0,1 beslaan. Wij geven de waarden van deze gemiddelden in tabel 18.

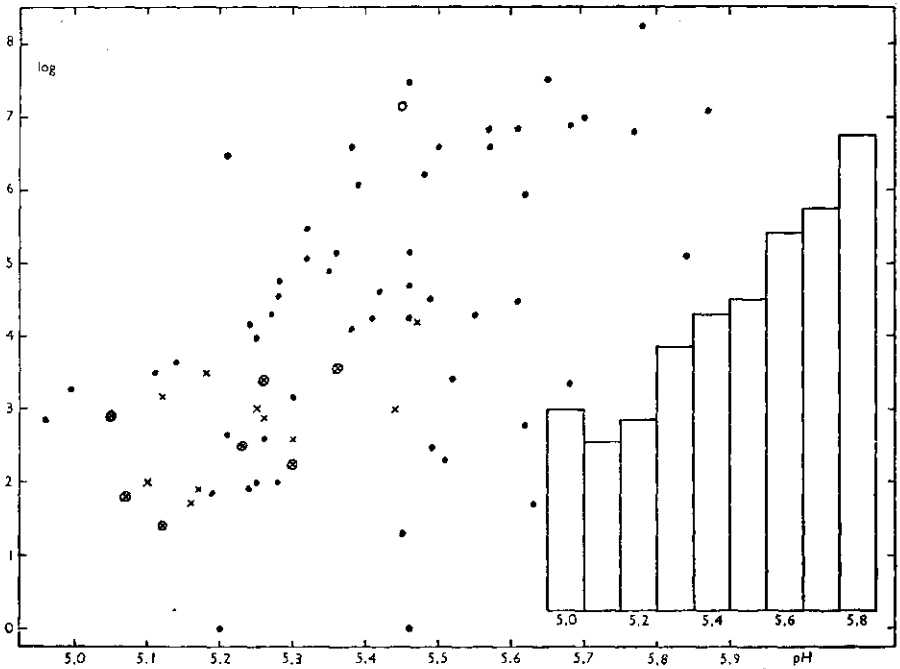

Fig. 24

pH van het middendeel en logarithme van het aantal propionzuurbacteriën in het midden bij kazen uit de practijk.
Teekens als in figuur 23.

TABEL 18

Gemiddelden van de aantallen propionzuurbacteriën in 76 praktijkkazen van verschillenden pH

pH randdeel	Aantal propionzuur-bacteriën	Aantal kazen	pH middendeel	Aantal propionzuur-bacteriën	Aantal kazen
4,95—5,05	1 600	5	4,95—5,05	1 000	3
5,05—5,15	900	6	5,05—5,15	400	6
5,15—5,25	1 200	21	5,15—5,25	700	11
5,25—5,35	50 000	19	5,25—5,35	7 000	16
5,35—5,45	90 000	17	5,35—5,45	20 000	9
5,45—5,55	850 000	5	5,45—5,55	30 000	14
5,55—5,65	—	—	5,55—5,65	260 000	9
5,65—5,75	150 000	3	5,65—5,75	560 000	3
5,75—5,85	—	—	5,75—5,85	6 200 000	5

Het is uit de verzamelde gegevens zeer goed te zien, dat ook bij de praktijkkazen de regel geldt, dat bij hoogeren pH meer propionzuurbacteriën worden gevonden. De spreiding is echter nog grooter dan bij onze proefkazen. Dit

behoeft niet te verwonderen, daar het materiaal veel heterogener was. Bij onze proefkazen werd steeds melk van hetzelfde bedrijf gebruikt. Ook waren de practijkkazen niet van denzelfden leeftijd. Voor zoover wij dit konden nagaan, liep deze uiteen van 4 tot 9 weken. De meeste Friesche kazen, welke in de grafische voorstellingen van de figuren 23 en 24 met een kruisje gemerkt zijn, waren hoogstens 5 weken, de meeste Zuidhollandsche en Utrechtsche kazen, gemerkt met een stip, 6 à 7 weken oud. Dan zijn bij al deze kazen van verschillende bedrijven de bewaringsomstandigheden verschillend geweest (bijv. wat temperatuur betreft), terwijl ook de meerdere of mindere besmetting der kaasmelk met propionzuurbacteriën van invloed geweest kan zijn. Wat dit laatste betreft, hebben wij een voorbeeld in de onderzochte Noordhollandsche Edammer kaas, gemerkt met een cirkel, die bij een pH van 5,28 in het randdeel en 5,45 in het middendeel 14 millioen propionzuurbacteriën bevatte; dit is dus abnormaal hoog. Bij dit bedrijf vonden wij in de kaasmelk 65 propionzuurbacteriën per ml, terwijl wij in de kaasbakmelk van de Proefzuivelboerderij moeite hadden om in 0,1 ml de aanwezigheid van propionzuurbacteriën vast te stellen.

Een andere belangrijke oorzaak van afwijking kan in nevengistingen gelegen zijn. Er zijn enkele aanwijzingen, dat de groei der propionzuurbacteriën door dien van andere nagistingsbacteriën beïnvloed wordt. Verder kunnen nevengistingen invloed op het propionzuurbacteriënaantal hebben doordat zij den pH veranderen. Bij boterzuurgisting bijv., welke zich in het middendeel der kaas afspeelt, stijgt de pH in dit middengedeelte sterk, terwijl in het randgedeelte de pH niet, of althans zeer weinig, stijgt. Door deze pH-stijging in het midden wordt daar een sterkere ontwikkeling van propionzuurbacteriën mogelijk, doch het verband tusschen het aantal bacteriën en den pH van het randgedeelte gaat hierdoor verloren.

Zooals reeds vroeger opgemerkt is, bestaat er altijd wel verschil tusschen den pH van het rand- en het middengedeelte van kaas. In de meeste gevallen is de pH in het midden hooger dan in den rand, doch soms is het omgekeerd. Dit laatste zou mogelijk verklaard kunnen worden door het „wateren" van de kaas, hetwelk toegepast wordt om de overmaat zout uit het randdeel uit te loogen, teneinde de kans op het ontstaan van witten rand te verminderen.

Bij de onderzochte kazen was in

3	gevallen	de	pH	in	het	midden	der	kaas	0,31 à 0,40	hooger	dan	in	den	rand,
9	„	„	„	„	„	„	„	„	0,21 à 0,30	„	„	„	„	„
19	„	„	„	„	„	„	„	„	0,11 à 0,20	„	„	„	„	„
30	„	„	„	„	„	„	„	„	0,01 à 0,10	„	„	„	„	„
11	„	„	„	„	„	„	„	„	0,01 à 0,10	lager	dan	in	den	rand
2	„	„	„	„	„	„	„	„	0,11 à 0,20	„	„	„	„	„

Bij de Friesche kazen waren er van de 18 monsters 11, waarvan de pH in den rand hooger was dan die in het midden, terwijl dit bij de Zuidhollandsche en Utrechtsche kazen slechts in 2 gevallen op de 57 het geval was.

Alle hierboven genoemde redenen maken de spreiding der practijkkazen in de grafieken grooter dan bij de proefkazen.

Uit de grafieken volgt, dat de Zuidhollandsche en Utrechtsche kazen gemiddeld meer propionzuurbacteriën bevatten dan de Friesche en ook, zooals uit de opgave in hoofdstuk 6 blijkt, dan de typische Edammer kazen. Voor een belangrijk deel vindt dit zijn verklaring in den hoogeren pH van de Goudsche kaas. Vergelijken wij evenwel Friesche fabriekskaas met Goudsche boerenkaas in hetzelfde pH-gebied, dan zou men geneigd zijn te veronderstellen, dat de Goudsche boerenkaas een hooger aantal propionzuurbacteriën bevat. Bij de Friesche kazen was een aantal, dat uit gepasteuriseerde melk bereid was (deze zijn in de grafieken gemerkt met een kruisje, omgeven door een cirkel), doch dit heeft blijkbaar dezen kazen geen aparte plaats in de propionzuurbacteriëngrafiek tusschen de andere Friesche kazen gegeven, al zou men mogelijk kunnen verwachten, dat dergelijke kazen propionzuurbacteriën-vrij zouden zijn, daar deze bacteriën pasteurisatie niet verdragen.

9. Beteekenis van propionzuurbacteriën voor Edammer en Goudsche kaas

Nu wij weten, dat de propionzuurbacteriën ook inheemsch zijn in het Nederlandsche zuivelbedrijf en dat zij wel altijd in kaas voorkomen, kunnen wij ons afvragen of zij voor de Nederlandsche kaas ook werkelijk van belang zijn, hetzij in gunstigen, hetzij in ongunstigen zin. Het feit, dat zij in zoo verschillende aantallen, uiteenloopend van bijna 0 tot wel 200 millioen per g, voorkomen, wijst er wel op, dat men zich de Nederlandsche kaas heel goed zonder deze bacteriën kan voorstellen. Zij behooren dus niet tot de obligate flora, zooals de melkzuurbacteriën en men kan dus niet zeggen, dat van hun ontwikkeling het al of niet goed slagen van de kaas afhangt.

Voor Edammer kaas kunnen wij met zekerheid zeggen, dat de propionzuurbacteriën voor de rijping van geen belang zijn. De typische Edammer kaas heeft van oudsher altijd een eenigszins zuur zuivel gehad en zooals wij weten komen hierin de bacteriën niet tot ontwikkeling. De Edammer kaas van z.g. ouderwetsche kwaliteit dankt haar gunstige eigenschappen dus in geen geval aan de medewerking van propionzuurbacteriën. Hiermede wil echter niet gezegd zijn, dat alle Edammer kaas, of ruimer gezegd, kaas in Edammer model, geen of slechts weinig propionzuurbacteriën zal kunnen bevatten.

Sedert men de kaasbereiding beter heeft leeren beheerschen, dank zij het verkregen inzicht in de processen, die zich in wrongel en jonge kaas afspelen, kan men kaas bereiden van verschillende eigenschappen en wordt tegenwoordig ter wille van een andere consistentie van het zuivel ook veel Edammer kaas gemaakt van een lageren zuurgraad. Hierin zal dus wel ontwikkeling van propionzuurbacteriën mogelijk zijn.

Voor Goudsche kaas is de toestand anders. Van oudsher werd de Goudsche kaas gemaakt door bij de nawarming warm water toe te voegen, terwijl bij de Edammer kaas nagewarmd werd met warme wei. Daardoor is van oudsher de pH van Goudsche kaas hooger dan die van Edammer. Bovendien verschilt de bereiding van deze kaas van bedrijf tot bedrijf en dikwijls van het eene kaasmaal op het andere zoo sterk,, dat er bij deze soort kaas een zeer groote gradatie in kwaliteiten en eigenschappen is. We zien dit bijv. in den pH, die voor normale Goudsche kaas wel van 4,95 tot 5,4 kan uiteenloopen en in niet zeldzame gevallen zelfs tot 5,6 in den rand kan gaan. Al is dus als gevolg van den gemiddeld hoogeren pH het gemiddeld aantal propionzuurbacteriën in Goudsche kaas wel hooger te achten dan dat in Edammer kaas, toch komen bij Goudsche boerenkaas ook vele gevallen voor van zeer goede kaas zonder een groot aantal van deze bacteriën. Ook in Goudsche kaas schijnen ze dus niet strikt noodig te zijn voor de rijping, doch, aangezien deze kaas ze toch in groote aantallen kan bevatten, is de vraag naar hun beteekenis hier van meer belang.

De invloed der propionzuurbacteriën kan zich uiten in den smaak en in de gasvorming. In de literatuur wordt wel degelijk waarde aan de propionzuurbacteriën toegekend voor den smaak van kaas. De typische zoetachtige smaak van Emmentaler kaas wordt aan deze bacteriën toegeschreven en HAMMER meent, dat de propionzure zouten dezen smaak aan de kaas geven. Echter moeten voor een dergelijke ontwikkeling wel zeer groote aantallen propionzuurbacteriën aanwezig zijn en als bij Goudsche kaas zulke aantallen gevonden worden, is de pH van de kaas meestal wel zóó hoog, dat daardoor gebreken in smaak ontstaan, die een eventueele gunstige werking van propionzuurbacteriën te niet doen of de beoordeeling of deze bacteriën werkelijk een typischen smaak veroorzaken, onmogelijk maken. Er komen echter in de practijk gevallen voor, dat men aan de kaas een eenigszins aan Emmentaler herinnerenden smaak bespeurt. Hier zijn de omstandigheden waarschijnlijk toevallig zóó geweest, dat juist nog een behoorlijke ontwikkeling van propionzuurbacteriën optrad en de gebreken als gevolg van den hoogeren pH nog juist niet tot uiting kwamen.

Bij proefkazen, welke wij maakten door de kaasmelk te enten met propionzuurbacteriën, konden wij echter niet concludeeren tot een verbetering van

den smaak, ook niet als wij zorgden, dat de zuurgraad der kaas zóó hoog was, dat andere smaakgebreken niet konden optreden. Vergeleken met parallelkazen uit niet met propionzuurbacteriën geënte melk, waren de geënte kazen meestal wee-zoet of esterachtig zuur (als zuurtjes), in geen geval beter. Slechts in een uiterst zeldzaam geval kregen wij tusschen onze proefkazen eens een zoetigen smaak, die niet onaangenaam was.

Propionzuurbacteriën ontleden melkzure zouten onder ontwikkeling van koolzuurgas. Indien dit gas in de kaas vrij zou komen, zouden de propionzuurbacteriën dus openingen in het zuivel veroorzaken of mogelijk bij zeer krachtige werking tot overmatige gasontwikkeling aanleiding geven. Deze gasvorming is dan een nagistingsverschijnsel, daar zij pas optreedt na de pekeling, als alle melksuiker tot melkzuur of melkzuur zout is omgezet. Een overmatige gasontwikkeling zou dan „laat-los" veroorzaken. De openingen zouden ronden vorm moeten vertoonen, daar de propionzuurbacteriën zich alleen vermeerderen in kaas van zoodanigen pH, dat het zuivel plastisch is. Nu treft men in Goudsche kaas nagistingsopeningen aan in allerlei vormen, bijv. veel kleine ronde openingen, enkele kleine ronde openingen, enkele groote „oogen" en vele groote oogen. Een gering aantal kleine of slechts matig groote oogen wordt veelal voor verlevendiging van de doorsnede gewenscht geacht, een groot aantal openingen daarentegen wordt als ongewenscht „laat-los" beschouwd.

Zooals in het historisch overzicht (hoofdstuk 2) medegedeeld is, zijn de meeningen over de mogelijkheid van het ontstaan van openingen door de werkzaamheid van propionzuurbacteriën niet geheel vaststaand en het bleek ook ons zeer zeker niet gemakkelijk de vorming van openingen in verband te brengen met de propionzuurbacteriën.

De propionzuurbacteriën vormen n.l. niet veel gistingsgas. In geëvacueerde buizen, welke slechts voor de helft met cultuurvloeistof gevuld zijn, ontstaat een gasspanning, die meestal slechts $^1/_4$ à $^1/_2$ atmosfeer bedraagt. Het ontstane gas is koolzuur (wij vonden in een speciaal daartoe genomen proef, dat het gistingsgas bestond uit 98 % kooldioxyde en 2 % stikstof, terwijl geen waterstof werd gevonden) en dit is in waterige vloeistoffen zeer gemakkelijk oplosbaar en wel sterker naarmate de druk hooger is. Hierdoor zou verwacht kunnen worden, dat in de kaas gevormd koolzuur niet gemakkelijk als gas, dus onder vorming van gistingsgaten, vrijkomt tegen den druk van de kaasmassa en dien van de omsluitende korst in. Toch bezitten wij zooveel aanwijzingen, dat wij het zeker achten, dat de propionzuurbacteriën ook in Nederlandsche kaas gasvorming kunnen veroorzaken. In een viertal punten bespreken wij thans deze aanwijzingen.

1. Bij het onderzochte materiaal aan practijkkazen zijn vele kazen, waarin geen andere nagistingsbacteriën dan propionzuurbacteriën werden gevonden. In deze kazen nu bleek in groote trekken meer gasvorming te zijn naarmate meer propionzuurbacteriën werden gevonden. Wij drukken hierbij enkele kaasfoto's af, waarbij men sterke gasvorming ziet in de kazen.

U I 7	met	4 000 000	propionzuurbacteriën	per g	(foto 1),
Z X T	„	6 500 000	„	„ „	(foto 2),
VII	„	13 000 000	„	„ „	(foto 3),
II	„	33 000 000	„	„ „	(foto 4),

terwijl geen nagistingsverschijnselen te zien zijn in de kazen:

U I 29	met	70	propionzuurbacteriën	(foto 5) en
F I 33	„	60	„	(foto 6).

Daartusschen liggen bijv. de gevallen der kazen:

Z X U	met	4 500	propionzuurbacteriën	(foto 7),
U I 1	„	43 000	„	(foto 8) en
U I 38	„	120 000	„	(foto 9).

Bij aanwezigheid van zeer veel propionzuurbacteriën zien we steeds een sterke gasontwikkeling in de kaas; zijn er weinig, dan kan men soms gatenvorming hebben, doch soms ook niet. Bij kaas Z X U bijv. is er duidelijk eenige nagisting zichtbaar, bij kaas F I 59 (foto 10) met 3500 propionzuurbacteriën, dus ongeveer evenveel, is geen enkele nagistingsopening in het zuivel aanwezig.

Er is dus geen scherp verband tusschen gasvorming en aantal propionzuurbacteriën. Ongetwijfeld hangt dit samen met de omstandigheid, dat het gistingsgas der propionzuurbacteriën het oplosbare koolzuur is. Indien er n.l. slechts betrekkelijk weinig gas ontstaat, blijft dit door den druk van de kaasmassa en de korst in oplossing en kan dus geen gaten vormen. Dit is bijv. het geval bij kaas F I 59 (foto 10). Het zuivel van de kaas kan echter reeds openingen bevatten vóórdat de groei der propionzuurbacteriën begint, zooals dit bij kaas F I 33 (foto 6) het geval is. Deze gaatjes zijn onregelmatig van vorm, omdat zij reeds in de wrongel aanwezig waren. Dan kan later het gistingskoolzuur in deze openingen in gasvorm overgaan en een zekeren druk veroorzaken, welke de reeds bestaande gaatjes van onregelmatigen vorm vergroot en opblaast tot meer bolvormige openingen, die dan gladden wand krijgen. Daar de reeds vóór de propionzuurgisting aanwezige gaatjes ontstaan zijn hetzij door coligisting of door het aanwezig zijn van ingesloten lucht bij de bereiding van de kaas (losse wrongel, doorhalen van de wrongel, waardoor deze z.g. „maakgaatjes" krijgt), kunnen we deze door het koolzuur

Foto 1
Practijkkaas U I 7 uit Utrecht

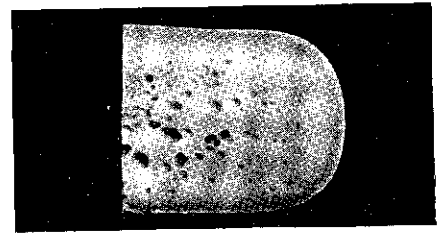

Foto 2
Practijkkaas Z X T uit Zuid-Holland

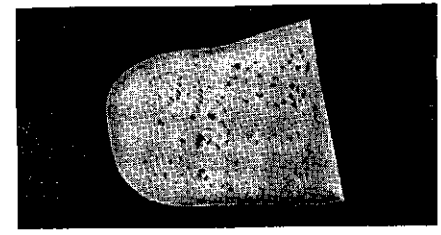

Foto 3
Practijkkaas VII uit Zuid-Holland

Foto 4
Practijkkaas II uit Zuid-Holland

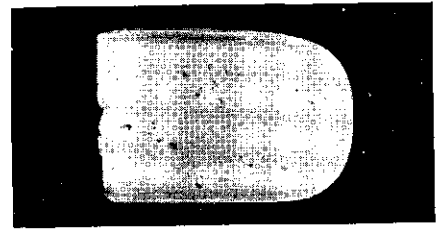

Foto 5
Practijkkaas U I 29 uit Utrecht

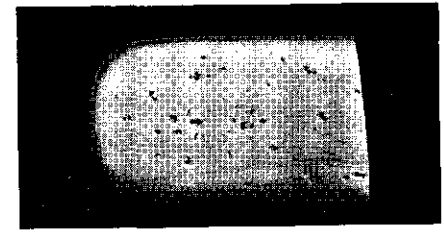

Foto 6
Practijkkaas F I 33 uit Friesland

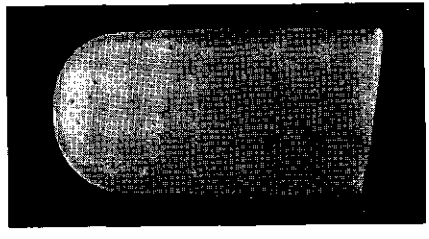

Foto 7
Practijkkaas Z X U uit Zuid-Holland

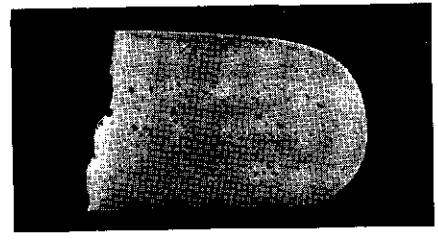

Foto 8
Practijkkaas U I 1 uit Utrecht

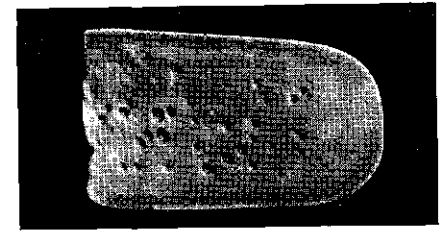

Foto 9
Practijkkaas U I 38 uit Utrecht

verwijde en gladwandig geworden gaatjes „opgeblazen coli- of maakgaatjes" noemen. Het is uit de foto 7 van kaas Z X U duidelijk, dat we bij deze kaas met een dergelijk geval te maken hebben.

In dicht zuivel (kaas uit één stuk) is de kans op het vrijkomen van koolzuurgas veel geringer en zal dus bij een gering aantal propionzuurbacteriën niets van nagisting te bemerken zijn (foto 10, kaas F I 59). In dit opzicht verdient ook kaas U II 18 (foto 11) nadere beschouwing. Deze kaas bestond uit een geheel gesloten deel en een deel met gistingsopeningen. Zij bevatte in het dichte deel 80 000 en in het open deel 35 000 propionzuurbacteriën per g. Op de foto kan men zien, dat in het open deel maakgaatjes aanwezig waren. In het randgedeelte zijn ze n.l. nog in onveranderden vorm aanwezig. Hoewel nu het dichte deel meer propionzuurbacteriën bevat dan het open gedeelte der kaas, is toch de gasvorming alleen zichtbaar geworden in het gedeelte met maakgaatjes. We zien hier allerlei overgangen tusschen het volmaakte ronde oog en het nog niet opgeblazen maakgaatje van onregelmatigen vorm. De groote diffusiemogelijkheid van het oplosbare koolzuur is hierbij eveneens van belang. Bij waterstofvormende bacteriën kan het vrijwel onoplosbare waterstofgas niet zoo gemakkelijk diffundeeren en ontstaan de gasholten dus eerder ter plaatse van het ontstaan van het gas. Daarentegen behoeft het aantal propionzuurbacteriën in het kaasgedeelte om de gaatjes heen niet grooter te zijn dan in de dichte deelen van de kaas. Bij de practijkkaas F I 50 vonden wij bijv. om de gaatjes heen 450 en in het dichte deel 850 bacteriën, bij proefkaas 3 O 2 vonden wij 80 000 bacteriën bij de gaatjes en 350 000 in de dichte stukken.

Ook bij sterke propionzuurgisting kunnen we nog menigmaal zien of deze gisting plaats gevonden heeft in een oorspronkelijk dichte kaas of in een kaas met maak- of coligaatjes. In het eerste geval ontstaan geïsoleerd liggende groote ronde gistingsgaten, eventueel door het liggen der kaas eenigszins vervormd, zooals in kaas II (foto 4), in het andere geval ontstaan zeer veel kleine ronde openingen, zooals in kaas U II 35 (foto 12), welke ongeveer 1 millioen propionzuurbacteriën per g bevatte. Bij kaas U I 7 (foto 1) is het aantal oorspronkelijk aanwezige onregelmatige gaatjes (die nog in het randdeel zichtbaar zijn) zóó groot geweest, dat de door de propionzuurgisting opgeblazen openingen door elkaar heen gegroeid zijn. Deze kaas bevatte op het moment van fotografeeren nog meer dan 1 millioen coliachtige bacteriën. Hier hebben we dus ongetwijfeld een geval van sterk opgeblazen coligaatjes. Ook bij kaas VII (foto 3), die nog 25 000 coliachtige bacteriën per g bevatte, is dit het geval.

2. Ook door eigen proeven hebben wij getracht nader inzicht in de gas-

vorming door propionzuurbacteriën te krijgen en wij geven hiervan als voorbeeld de kazen:

L 3 met 6 200 000 propionzuurbacteriën (foto 13) en
W 4 „ 200 000 000 „ (foto 14),

terwijl de kazen K 1 (foto 15) en Q 1 (foto 16) het resultaat zijn van een parallelproef met bereiding van kaas uit 1 stuk en kaas uit „doorgehaalde" wrongel, waarbij de kaas uit 1 stuk nog niet in staat was het koolzuurgas af te scheiden en de kaas met openingen wel. De vorm van de Edammer kaas laat niet zoo gemakkelijk het ontstaan van openingen toe als de Goudsche, omdat een Goudsche kaas bij gelijkblijvend korstoppervlak haar volume nog vergrooten kan en een bolvormige kaas niet.

3. Door analyse van het gistingsgas kan ook bepaald worden of in kazen met alleen propionzuurgisting de gasholten door de werking van deze bacteriën ontstaan zijn. In dat geval mag n.l. geen waterstof in het kaasgas aanwezig zijn. Bij gasanalyse van 3 practijkkazen, waarin alleen propionzuurbacteriën als nagistingsbacteriën gevonden werden (foto's 17, 18 en 19), vonden wij uitkomsten als in tabel 19 vermeld.

TABEL 19

Analyse van practijkkazen

	U IV 11	U IV 28	U IV 52
pH rand	5,26	5,40	5,36
pH midden	5,38	5,46	5,48
Aantal propionzuurbacteriën	4 000 000	50 000	1 700 000
% koolzuur in het gistingsgas	27,1	26,5	78,4
% waterstof in het gistingsgas	0,0	0,0	1,3
% stikstof in het gistingsgas	72,9	73,5	20,3

Het gas werd verzameld door kruimelen der kaas onder met koolzuur verzadigd water en opvanging met behulp van een omgekeerden trechter. Inderdaad zien we, dat het waterstofgas ontbreekt, behalve tot een zeer klein bedrag in kaas U IV 52. Opvallend is echter de groote hoeveelheid stikstof. Bij een analyse van het gas, ontstaan in een cultuur van propionzuurbacteriën in gistautolysaat-Na-lactaat, vonden wij slechts 2% stikstof. Mogelijk is het stikstofgas in de kaas afkomstig van ingesloten en opgeloste lucht, waaruit de zuurstof tijdens het bewaren van de kaas is geabsorbeerd. In overeenstemming met deze opvatting is dan ook het stikstofgehalte van het

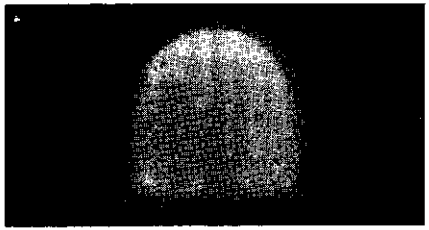

Foto 10
Practijkkaas F I 59 uit Friesland

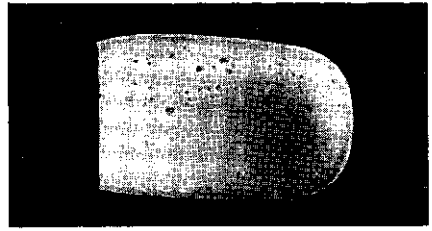

Foto 11
Practijkkaas U II 18 uit Utrecht

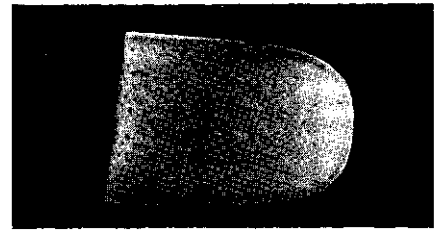

Foto 12
Practijkkaas U II 35 uit Utrecht

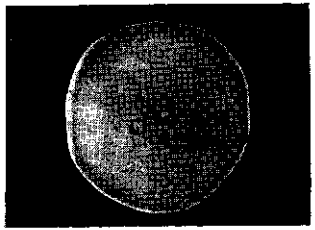

Foto 13
Proefkaas L 3

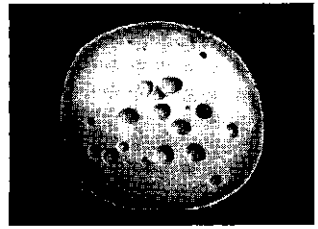

Foto 14
Proefkaas W 4

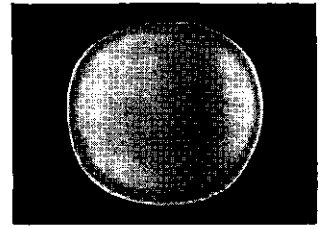

Foto 15
Proefkaas K 1

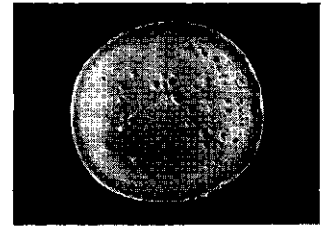

Foto 16
Proefkaas Q 1

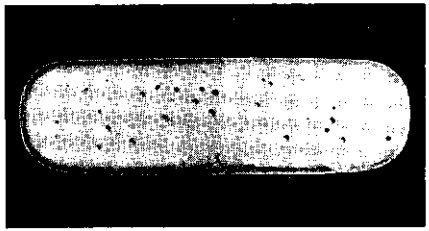

Foto 17
Practijkkaas U IV 11 uit Utrecht

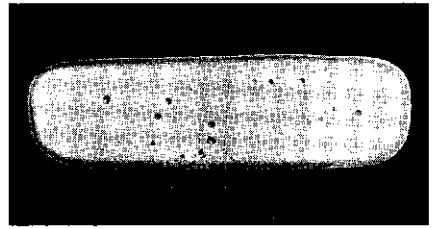

Foto 18
Practijkkaas U IV 28 uit Utrecht

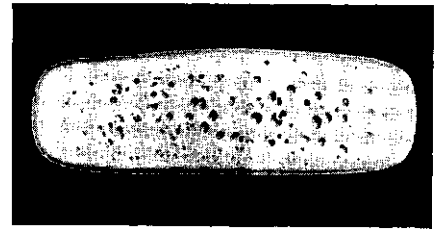

Foto 19
Practijkkaas U IV 52 uit Utrecht

gas in kaas U IV 52, waarin zeer veel meer gas was vrijgekomen dan in de andere twee kazen (wel 10 maal zoo veel), veel lager.

4. Ook in eigen proefkazen werd bij analyse wel gas zonder waterstof gevonden.

Al deze waarnemingen voeren dus tot de conclusie, dat propionzuurbacteriën in staat zijn gasopeningen in de kaas te veroorzaken; bij betrekkelijk kleine aantallen in matige hoeveelheid en grootte, zooals wel gewenscht wordt, bij zeer groote aantallen in te sterke mate, zoodat de kaas het ongewenschte gebrek „laat-los" gaat vertoonen.

Deze gasontwikkeling zal echter in sterke mate beïnvloed worden door tal van factoren, zooals de zachtheid van het zuivel, de stevigheid van de korst, die een tegendruk uitoefent, de aanwezigheid van kleine luchtholten of van coligaatjes, de snelheid der gasontwikkeling, de temperatuur, enz.

In belangrijke mate wordt zij natuurlijk beïnvloed door de ontwikkelingsmogelijkheid van de propionzuurbacteriën en deze wordt voor een groot deel bepaald door den zuurgraad.

Zoo geeft dus het onderzoek een verklaring voor de vroeger reeds veelvuldig gedane waarneming, dat kaas met hoogen pH tot overmatige gasontwikkeling neigt.

De bestrijding van het gebrek „laat-los door propionzuurbacteriën" is dan ook zeer eenvoudig mogelijk door ervoor te zorgen, dat de kaas den juisten zuurgraad heeft. In het algemeen speelt bij het los worden van kaas door propionzuurbacteriën de besmetting met deze bacteriën geen rol, omdat deze bacteriën altijd in het zuivelbedrijf voorkomen. Deze vorm van laat-los onderscheidt zich dus scherp van een laat-los door boterzuurbacteriën of boekelscheurbacteriën, waarbij de oorzaak steeds bij een besmetting gezocht moet worden.

Resumeerende moeten wij tot de conclusie komen, dat de aanwezigheid van veel propionzuurbacteriën in Nederlandsche kaassoorten ongewenscht is. Zij wijst op een te hoogen pH der kaas; abnormale gasvorming is hiervan vrij zeker het gevolg en de smaak en geur der kaas worden er niet gunstig door beïnvloed.

OVERZICHT

Propionzuurbacteriën, die in kaas melkzuur aantasten onder vorming van propionzuur, azijnzuur en koolzuur, en die beschouwd worden als van belang te zijn voor de oogenvorming en den smaak van Emmentaler kaas, bleken

ook in Goudsche en Edammer kaas voor te komen. Men kan ze op verschillende wijze aantoonen, bijv. met behulp van vloeibare voedingsbodems (pepton-Ca-lactaat-oplossing of gistautolysaat-Na-lactaat) of met vaste voedingsbodems (gistautolysaat-pepton-Na-lactaat-water-agar of -kiezelzuur). In de vaste agarbodems ontstaan groote koloniën van typischen vorm (zie foto's). Voor het aantoonen en tellen van propionzuurbacteriën in kaas maakten wij bijna uitsluitend gebruik van den agarvoedingsbodem.

Het aantal in Goudsche kaas voorkomende propionzuurbacteriën bleek sterk uiteen te loopen (zie de gegevens in hoofdstuk 6). Wij vonden in verschillende kazen aantallen varieerend van 0 tot 180 millioen per g kaas (bepaald in het middendeel der kaas). Ontbreken van propionzuurbacteriën kwam slechts zeer zelden voor. In Edammer kaas schijnt slechts een beperkt aantal voor te komen (tenzij in abnormale gevallen), doch ook bij deze kaassoort waren ze bijna nooit geheel afwezig. Hieruit blijkt wel, dat de propionzuurbacteriën steeds in het zuivelbedrijf aanwezig zijn.

Er deed zich nu dadelijk de vraag voor, waarom verschillende kazen zoo'n uiteenloopend aantal propionzuurbacteriën bevatten. Deze vraag werd beantwoord door de studie van een groot aantal proefkazen, waarbij bleek, dat vooral de pH van de kaas een zeer grooten invloed heeft op de ontwikkelingsmogelijkheid der propionzuurbacteriën. Hoe hooger de pH van kaas is, des te meer propionzuurbacteriën zullen aanwezig zijn. De grafieken 1—14 geven het verband aan tusschen den pH van kaas (hetzij in rand- of middengedeelte) en het aantal op het oogenblik van meting gevonden propionzuurbacteriën bij verschillenden ouderdom der kaas. De invloed van den pH op de ontwikkelingsmogelijkheid der propionzuurbacteriën is zelfs zóó groot, dat eenige eenvoudige regels konden worden opgesteld over het te verwachten aantal propionzuurbacteriën als de pH van de jonge kaas bekend is (zie blz. 1129).

Andere factoren, als zoutgehalte, vochtgehalte en beginaantal bacteriën, hebben ook wel eenigen invloed, doch zij spelen tegenover den pH slechts een ondergeschikte rol. Belangrijker is de bewaringstemperatuur en wel in dien zin, dat bij hoogere temperatuur de propionzuurbacteriën zich in de kaas sneller ontwikkelen en het tenslotte bereikte maximum-aantal bacteriën hooger is (zie tabel 15).

De groei der propionzuurbacteriën vindt plaats na de pekeling van de kaas, dus pas als de melkzuurgisting reeds lang afgeloopen is. Is deze laatste meestal reeds na 1 dag beëindigd, de eerste begint eigenlijk pas na 2 weken merkbaar te worden. Meestal gaat de groei door tot een leeftijd der kaas van ongeveer 2 maanden. In deze periode is de groei tusschen ongeveer den twintigsten en den veertigsten dag het snelst. Na 2 maanden treedt meestal een langzame daling van het bacterie-aantal in.

Ook in de practijkkazen bleek het verband tusschen pH der kaas en propionzuurbacteriënaantal te bestaan (zie de grafieken 23 en 24). De spreiding was hier wel grooter dan bij onze proefkazen, doch dit behoeft geen verwondering te wekken, daar de herkomst zeer verschillend, de bewaringswijze niet dezelfde en ook de ouderdom dezer kazen niet gelijk was.

Daar de gemiddelde Goudsche boerenkaas een hoogeren pH heeft dan de gemiddelde fabriekskaas en ook dan de gemiddelde Edammer kaas, is daaruit het hoogere aantal propionzuurbacteriën in de eerstgenoemde soort te verklaren.

Vragen wij naar de beteekenis van propionzuurbacteriën voor de Nederlandsche kaas, dan kunnen we zeker zeggen, dat in Edammer kaas van goede kwaliteit zóó weinig van deze bacteriën aanwezig zijn, dat ze voor deze kaas van geen belang kunnen zijn. Wordt bij de bereiding der kaas zóó gewerkt, dat een hoogere pH ontstaat, dan zal in zulke kaas toch ook groei van propionzuurbacteriën kunnen geschieden.

In Goudsche kaas maken de propionzuurbacteriën gewoonlijk een grooter deel van de flora uit. Wij kunnen evenwel niet zeggen, dat zij voor den smaak van deze kaas van veel belang zijn. Een matig aantal heeft geen invloed op reuk en smaak, een zeer groot aantal treft men alleen aan in kazen van zoodanig hoogen pH, dat hierdoor smaak- en reukgebreken ontstaan, die een eventueel gunstige werking der propionzuurbacteriën onwaarneembaar maken. In zeldzame gevallen, als de bedoelde smaakgebreken niet zijn opgetreden, kan men soms een aan Emmentaler kaas herinnerende flauw-zoeten smaak smaak aantreffen. Bij onze proefkazen vonden wij bij aanwezigheid van veel propionzuurbacteriën meestal een wee-zoeten en esterachtig zuren smaak.

Belangrijker zijn de propionzuurbacteriën voor het ontstaan van gasholten of gistingsgaten in de kaas. Daar één hunner gistingsproducten kooldioxyde is, kunnen zij oogen in het zuivel veroorzaken. Kooldioxyde is echter een in kaasvocht oplosbaar gas, zoodat het niet in alle gevallen zeker is, dat het ontstane koolzuur gasopeningen in de kaas teweeg zal brengen. Dit zal bijv. kunnen afhangen van den druk van de omsluitende kaaskorst en de stevigheid van het zuivel. Bij groei van een zeer groot aantal propionzuurbacteriën zal wel steeds veel gas in de kaas vrijkomen en verschijnselen van laat-los veroorzaken. De propionzuurbacteriën zijn dus de verwekkers van de overmatige gasvorming, die wij reeds vroeger zoo vaak in kaas van hoogen pH konden waarnemen.

Zijn niet al te veel propionzuurbacteriën aanwezig, dan kunnen zij aanleiding teven tot het ontstaan van de vaak gewenschte gaatjes van beperkt aantal en beperkte grootte in de kaas. De aandacht werd erop gevestigd hoe reeds vóór de propionzuurgisting in de kaas aanwezige gaatjes (z.g. maak-

gaatjes of ook coligaatjes) bevorderend kunnen zijn voor het in gasvorm overgaan van het koolzuur. Deze gaatjes, die eerst van onregelmatigen vorm zijn, worden door het zich daarin verzamelende koolzuur verwijd tot „opgeblazen maakgaatjes" of „opgeblazen coligaatjes" van meer ronden vorm. De oorspronkelijke onregelmatige en kleinere gaatjes blijven dan in het randgedeelte der kaas onveranderd.

De bestrijding van laat-los door propionzuurbacteriën zal gericht moeten zijn op het maken van kaas van hoogeren zuurgraad, hetgeen men kan bereiken door beperking der watertoevoeging.

UEBERSICHT

PROPIONSÄUREBAKTERIEN IN GOUDA- UND EDAMER KÄSE

Die Propionsäurebakterien sind typische Käsebakterien, weil sie milchsaure Salze, die einzige stickstoffreie Kohlenstoffquelle im Käse, mit Leichtigkeit vergären. Schon seit dem Anfange dieses Jahrhunderts ist bekannt dasz Käse vom Emmentaler Typus grosze Mengen dieser Bakterien enthält und man ist der Meinung dasz ihre Entwicklung wichtig ist für Geschmack, Geruch und Lochbildung dieses Käses.

Wir haben untersucht ob auch in holländischen Käsen (Edamer und Gouda) Propionsäurebakterien vorkommen, obwohl sie die starke Löchung von Schweizerkäse normalerweise nicht zeigen. Für den Nachweis und die Zählung gebrauchten wir mehrere Nährböden, z. B. Pepton-Ca-Laktat-Lösung, Hefeautolysat-Na-Laktat (beide in evakuierten und zugeschmolzenen Röhrchen) und die festen Hefeautolysat-Pepton-Na-Laktat-Agar oder -Kieselsäure in Röhrchen mit Pyrogallolverschlusz. Auch Käsegelatine und Pepton-Ca-Laktat-Gelatine erwiesen sich als brauchbar. In Agar- und Kieselsäureböden bilden die Propionsäurebakterien Kolonien von karakteristischer Form (Foto A, B, C, D und E). Diese Form entsteht wahrscheinlich dadurch, dasz die Kolonien den Zusammenhang des Agars in bestimmten Richtungen schwächen. In Gelatine sind die Kolonien kugelrund.

Alle aufgegebenen Zahlen beziehen sich auf die Agarmethode, wobei geimpft wurde mit von 0,1 g Käse bis 1 zehnmillionstel g. Von jeder Verdünnung wurden 2 Röhrchen geimpft. Die Kolonien wurden nach 10—14-tagige Bebrütung bei 30° C gezählt.

Typische Edamer Käse enthielten nur wenige Propionsäurebakterien. Auch im Gouda Fabrikkäse wurden höchstens nur 3000 pro g gefunden. Im Gouda Bauernkäse jedoch war die Anzahl sehr verschieden. Es gab Käse mit sehr wenigen und Käse mit Millionen von Propionsäurebakterien pro g (genaue Daten in Abschnitt 6). Nur in einzelnen Fällen waren keine Propion-

säurebakterien nachzuweisen. Man kann daraus schlieszen, dasz in den Molkereibetrieben die Propionsäurebakterien immer anwesend sind.

Es fragte sich nun sofort, warum in diesem Käse so wenige und in jenem Käse so viele dieser Bakterien zu Entwicklung gekommen waren. Diese Frage wurde an einer groszen Anzahl selbst bereiteten Versuchskäse studiert. Aus Tabelle 3 ist schon an den wenigen angeführten Beispielen von Parallelversuchen aus unseren vielen Versuchsreihen ersichtlich, dass das pH für die Wachstumsmöglichkeit äuszerst wichtig ist. Alle Versuchsergebnisse wurden in graphischen Darstellungen (Abb. 1—14) geordnet. In jeder Darstellung sind die logarithmischen Mittelwerte der Propionsäurebakterienzahlen in pH-Strecken von 0,1 pH rechts unten in Rechtecken gezeichnet worden. Aus diesen Figuren ist der Schlusz zu ziehen, dasz die Entwicklung der Propionsäurebakterien vom pH der Käse bestimmt wird. Alle die Käse wurden bei 18° C aufbewahrt. Das Wachstum fängt ungefähr am 15. Tag an. Die Anzahl Bakterien in der Mitte des Käses hängt zusammen mit dem pH der Käsemitte aber auch mit dem des Randteiles des Käses. Die Tabellen 4 und 5 geben die bei unseren Versuchen gefundenen Mittelwerte der Propionsäurebakterienzahlen in Käsen von verschiedenem Alter in Beziehung zum pH, gemessen im selben Alter.

Während des Aufbewahrens der Käse steigt das pH stetig an. Wenn man also damit bekannt wäre, wie das pH sich mit der Zeit ändere, würde man, mittelst einer pH-Messung im jungen Käse, im Stande sein vorherzusagen, wie stark die Entwicklung der Propionsäurebakterien im Käse sein würde. Bei unseren Versuchskäsen war der pH-Verlauf wie in der Tabelle 6 und in der graphischen Darstellung 15, und daraus konnte mit Hilfe der Tabelle 5 die Anzahl zu erwartenden Propionsäurebakterien nach verschiedenen Zeiten berechnet werden. Auch diese Zahlen sind in der Tabelle 6 angegeben.

Mehrere von unseren Versuchskäsen wurden nach verschiedenen Zeiten untersucht. Somit konnten wir mit den in diesen Käsen gefundenen Zahlen auch unmittelbar die Beziehung zwischen pH in einem gewissen Alter und Propionsäurebakterienanzahl in einem späteren Alter nachweisen (Abbildungen 16—21). Mittelwerte der gefundenen Zahlen geben die Tabellen 7—9. Wir kamen dabei zu folgenden wichtigen Schluszfolgerungen:

1. Wenn der Käse einen Tag nach der Bereitung ein pH unterhalb 5,0 hat, wird kaum ein Wachstum der Propionsäurebakterien folgen; weist er ein pH oberhalb 5,1 an, so wird später ein starkes Wachstum auftreten.

2. Wenn das pH in Käse von 6—8 Tagen 5,0 bis 5,1 ist, wird nachher die Propionsäurebakterienanzahl höchstens bis einige Zehntausende steigen können; ist es oberhalb 5,15, so sind mehrere Hunderttausende oder Millionen zu erwarten.

3. Wenn nach 3 Wochen das pH unterhalb 5,1 ist, wird kaum eine Entwicklung zu erwarten sein; bei einem pH von 5,1—5,2 wird die Zahl später nicht über einige Zehntausende steigen; ist das pH 5,2—5,3, dann wird eine Höchstzahl von einigen Hunderttausenden erreicht und wenn das pH oberhalb 5,3 ist, wird ein Wachstum bis zu Millionen folgen.

Obgleich das pH der wichtigste Faktor ist für die Entwicklungsmöglichkeit der Propionsäurebakterien, gibt es noch andere, die einen geringeren Einflusz darauf ausüben.

Hierzu gehören z. B. der Salzgehalt und der Wassergehalt des Käses. Beide sind Ursache dasz die Propionsäurebakterienzahl im Randteil des Käses niedriger ist als in der Mitte (Tabelle 10). Der Einflusz der Salzkonzentration im Käse ist erst bemerkbar wenn sie sehr hoch oder sehr niedrig ist (Tabellen 11, 12 und 13). Selbstverständlich übt das Salz keinen Einflusz aus wenn das pH so niedrig ist, dasz schon darum allein kein Wachstum von Propionsäurebakterien möglich ist.

Die Aufbewahrungstemperatur ist wichtig für die Bakterienentwicklung. Bei höheren Temperaturen (z. B. 21°—22° C) ist das Wachstum schneller und wird eine höhere Bakterienzahl erreicht (Tabelle 15).

Die Anzahl der Propionsäurebakterien im frischen Käse beinfluszt die später erreichte Höchstzahl. Wenn z. B. im Anfang einige Millionen Bakterien in die Milch geimpft werden, vermehren sie sich auch bei niedrigen pH-Werten (Tabelle 16).

Das Wachstum der Bakterien ist bei 18° C erst nach ungefähr 60 Tagen beendet. Dann folgt ein langsames Absterben (Mittelwerte zeigt Tabelle 17 und Abb. 22).

Eine grosze Anzahl Käseproben aus der Praxis wurde untersucht. Obwohl die Initialinfektion, die Aufbewahrungszeit und die Aufbewahrungstemperatur durchaus verschieden waren, war auch bei diesen Käsen die Beziehung zwischen pH und Anzahl klar (Abbildungen 23 und 24. In diesen Abbildungen bedeutet: ● Bauernkäse, × Fabrikkäse und ⊕ Fabrikkäse aus pasteurisierter Milch). Die höhere mittlere Anzahl von Propionsäurebakterien in Gouda Bauernkäse ist grösztenteils mittelst des höheren mittleren pH zu erklären.

Aus den Zahlen geht hervor, dasz die Propionsäurebakterien für den holländischen Käse von guter Beschaffenheit keine Bedeutung haben, weil sie sich darin nur wenig vermehren. Wenn sie sich in groszen Mengen im Käse entwickeln können, kann man Nachgärungsfehler erwarten (Foto 1, 2, 3 und 4). Wenn die Bakterienzahl nicht zu hoch oder zu niedrig ist, kann nur eine mäszige Löchung (in oft erwünschtem Umfange) entstehen (Foto 7, 8 und 9), aber diese Löchung entsteht in diesen Fällen nicht immer. Die Käse von Foto 7 und 10 z. B. haben dieselbe Anzahl Propionsäurebakterien. Die Propion-

säurebakterien bilden nämlich nur Kohlendioxyd als Gärungsgas und weil dieses Gas in wässerigen Stoffen löslich ist, kann es im Käse nicht immer gegen den Druck der Rinde und des Teiges in Gasform frei werden. Wenn sich jedoch von vornherein kleine Löcher im Käseteig vorfinden, kann das entwickelte Gas sich hierin ansammeln und die anfänglich unregelmäszige kleine Löcher zu gröszeren und runden Löchern auftreiben. Dies ist z. B. der Fall bei vorangegangenen Coligärung oder bei Käsen mit eingeschlossenen Luftblasen.

Bei starker Entwicklung von Propionsäurebakterien werden grosze Löcher entstehen in anfänglich geschlossene Käsen, aber viele kleineren Löcher in Käsen mit Coligärung.

Eine nachträgliche Blähung, von Propionsäurebakterien verursacht, kann bekämpft werden indem man dafür Sorge trägt, dasz das pH nicht zu hoch ausfällt, was zu erreichen ist durch geringeren Wasserzusatz zur Milch oder zum Bruch.

SUMMARY

PROPIONIC ACID BACTERIA IN GOUDA AND EDAM CHEESE

The propionic acid bacteria are typical cheese bacteria, because lactate, which is the only nitrogen free carbon source in cheese, is easily fermented by them. Cheeses of the Emmental type generally contain large numbers of these bacteria, as in known since 1904. It is assumed that they are responsible for the eye-formation and flavor in this type of cheese.

We have investigated whether the propionic acid bacteria are present in cheese of the Netherland type (Gouda and Edam) too, though normal cheeses of this type do not show the heavy eye-formation of Swiss cheese.

For the detection of the bacteria and the estimation of their number we made use of several media. The liquid media used were pepton-Ca-lactate-water and Na-lactate-yeastautolysate; the solid ones: yeastautolysate-pepton-Na-lactate-agar or -silicic acid gel, cheese gelatine and pepton-Ca-lactate-gelatine. In agar- and silicic acid gel media the colonies of the propionic acid bacteria show a characteristic form (Foto A, B, C, D). Probably the agar is weakened in certain directions by the growth of the colonies. The gelatine colonies are spherical.

As the agar method gave satisfying results the numbers of propionic acid bacteria mentioned in this investigation were determined in this way. Dilutions of cheese from 0,1 to 0,000 000 1 gram were inoculated in duplicate agar tubes. The cultures were made anaerobic with pyrogallol-Na-carbonate after solidification. They were kept at 30° C and the colonies were counted after 10—14 days.

In Edam cheese of good quality the number of propionic acid bacteria was very low; manufacture made Gouda cheese, also contained few of them, generally not above 3000 per gram. The number of these bacteria in Gouda farm cheese however varied considerably, viz. from 0 to 180 000 000 per gram (see data in chapter 6). Only seldom a cheese was met with, which contained no propionic acid bacteria. Consequently we must consider the propionic acid bacteria to be always present in kettle milk.

As to the great variety in the numbers of bacteria it seemed of importance to know why the bacteria developed more or less in the various cheeses. This problem was studied with a great number of experimental cheeses, made at our farm. The cheeses were kept in a room of 18° C. From the few instances in table 3 it is seen that the pH is an important factor for the development of the propionic acid bacteria. In the graphs 1—14 the results of all experiments are represented. At the right hand side of each graph the logarithmical averages in rates of 0,1 pH are drawn in rectangulars. From these graphs the conclusion may be drawn that the rate of growth depends on the pH of the cheese. The first sings of growth are observed about the 15th day. The number of bacteria in the inner part of the cheese is not only related with the pH of the middle of the cheese but also with that of the edge. The tables 4 and 5 give the logarithmical averages of the number of propionic acid bacteria in cheeses of different ages in relation to the pH, measured at the same time as the bacteriological analysis was made.

The pH rises slowly during the keeping of the cheese. If this rise of the pH were known, a pH measurement in young cheese would enable us to prophesy what number of propionic acid bacteria will develop later in the cheese. The average pH-rise in our experiments can be read from table 6 and graph 15. With the aid of table 5 we could calculate the probable number of bacteria in cheese of a certain age in relation to the pH, measured at an earlier date. These numbers are also mentioned in table 6.

Cheeses of several experiment-series were analysed after different keeping times. Thus the relation between pH at a certain time and bacterial number at a later date could be determined in a direct way (graphs 16—21). The averages of these experiments are to be found in tables 7—9. Our conclusions were:

1. If the pH of cheese after 1 day is below 5,0, no growth of propionic acid bacteria will occur; if it is over 5,1, an abundant growth will follow.

2. If the pH of cheese of 6—8 days is 5,0—5,1, not more than a few tenthousands of bacteria will develop later; if it is above 5,15, several hundreds of thousands or even millions may be expected later.

3. If after three weeks the pH of the cheese is below 5,1, no growth

will take place; if 5,1—5,2 then the maximum reached will be some ten-thousands; if 5,2—5,3, the maximum will be hundreds of thousands and if the pH is above 5,3, millions of propionic acid bacteria are to be expected later.

Though the pH of cheese is the most important governing factor for the development of propionic acid bacteria it is not the only one. Salt concentration and water content have some effect. Their combined influence is the cause of a lower bacterial number in the outer parts of the cheese (table 10). The effect of the salt concentration is only noticeable when it is very low or very high (tables 11, 12 and 13). As a matter of fact no effect of the salt content is observed when the pH of the cheese is so low that it makes growth impossible.

The keeping temperature of the cheese is of great importance. At a temperature of 21° C the growth is more rapid and a higher bacterial number is reached (table 15).

The number of propionic acid bacteria in the kettle milk has some effect on the growth. If the milk is inoculated with millions of bacteria, growth is even observed at a low pH (table 16).

At 18° C growth of the bacteria occurs till abouth the 9th week. Then a slow decrease follows (averages in table 17 and graph 22).

In a great number of cheeses of the practice the content of propionic acid bacteria was determined. From the graphs 23 and 24 it may be seen that with these cheeses too a relation exists between pH of the edge (graph 23) or the middle of the cheese (graph 24) and the number of propionic acid bacteria. The relation is not so close as with our experiment-cheeses, but attention must be drawn to the fact that with the cheeses of the practice the contamination of the kettle milk, the keeping time and the keeping temperature were different. In the graphs ● means farmer cheese, × are samples of cheese manufactures and ⊗ are samples of cheese made from pasteurized milk.

In farmer cheese the number of propionic acid bacteria generally is higher than in the cheese of manufactures. The higher pH generally found in farmer cheese is mainly responsible for this.

For the ripening of Gouda and Edam cheese the propionic acid bacteria are of no importance. If however they develop in large numbers in the cheese they may cause subsequent blowing (Foto 1, 2, 3, 4). If growth occurs only to a certain extent a desired eye-formation may take place (foto 7, 8, 9), but often we see that in cheeses with the same number of propionic acid bacteria, one shows the eyes and another does not (foto 7 and 10). This must be ascribed to the solubility of the fermentation gas, which is carbon dioxyde only. The pressure of the rind and the resistance of the cheese curd can prevent

the formation of gasholes. However if from the beginning small gasholes are present in the curd a gas pressure of carbon dioxide can develop in these holes, which are then blown up from irregular small ones to larger spherical ones. Such small gasholes which favor the formation of eyes may be present in freshly made cheese (air holes) or may be formed as the result of a coli fermentation in the cheese. When a heavy propionic acid fermentation occurs in the cheese one also can distinguish between a gas formation in cheese in which smal gas holes were originally present and in cheese without such holes. In the first case we observe a large number of small holes and in the latter a small number of large holes.

A subsequent blowing, caused by a propionic acid fermentation in the cheese can be prevented by taking care that the pH of the cheese is sufficiently low.

LITERATUUR

(1) F. J. Babel and B. W. Hammer. Flavor contributors of Swiss-type cheese. *Food. research 4* (1939) 81.

(2) F. J. Babel and B. W. Hammer. Bacteriology of cheese. IV. Factors affecting the ripening of Swiss-type cheese made from pasteurized milk. *Research bulletin Ames, Iowa*, n°. 264, Nov. 1939.

(3) F. J. Babel. Bacteriological studies on Swiss-type cheese from pasteurized milk *Iowa State Coll. Journ. Sci. 39* (1939) 6.

(4) F. W. J. Boekhout en J. J. Ott de Vries. De normale gasvorming in kaas. *Versl. van landbk. Onderz. 21* (1917) 14. Jaarverslag der Proefzuivelboerderij over 1915, 73.

(5) R. Burri. Anwendung von Propionsäurebakterienkulturen in der schweizerischen Emmentaler Käserei. Milchw. Weltkongress. 1937 II, 177.

(6) W. M. Clark. A. study of the gases of Emmental cheese. Bur. of Animal Ind., *Bull.* 151 (1912).

(7) F. Domke. Beitrag zur Kenntnis der Propionsäurebakterien. Milchw. Forschungen *15* (1933) 480.

(8) K. J. Demeter und A. Janoschek. Vorkommen und Entwicklung der Propionsäurebakterien in verschiedenen Käsearten. *Zentr. bl. f. Bakt. II 103* (1941) 257.

(9) W. Dorner und M. Thöni. Der Propionsäurebakteriengehalt von Milch und käsereitechnischwichtigen Stoffen. *Landw. Jahrb. d. Schweiz* 1936, 859.

10) W. Dorner und M. Thöni. Zur Biologie der Propionsäurebakterien. *Landw. Jahrb. d. Schweiz* 1936, 889.

(11) W. Dorner, O. Langhard, W. Mosimann und P. Ritter. Käsereiversuche mit Propionsäurebakterienkulturen. *Schweiz. Milchz.* 1938, n°. 98.

(12) W. Dorner und W. Mosimann. Der Propionsäurebakteriengehalt des 24-stündigen Emmentalerkäses. *Landw. Jahrb. d. Schweiz* 1939, 281.

(13) W. Dorner. Recherches sur les bactéries propioniques. *Le Lait 19* (1939) 897.

(14) W. Dorner und M. Thöni. Untersuchungen über kokkenförmige Propionsäurebakterien. *Landw. Jahrb. d. Schweiz* 1939. 86.

(15) E. E. Eldredge and L. A. Rogers. The bacteriology of cheese of the emmental type. *Zentr. bl. f. Bakt. II 40* (1914) 5.

(16) W. C. Frazier and H. E. Wing. Studies on the eye-formation of Swiss cheese. *Journ. of Bact. 21* (1931) 39.

(17) W. C. Frazier and H. E. Wing. Bacterium acidi propionici and other lactate fermenting bacteria of Swiss cheese. *Journ. of Bact. 23* (1932) 60.

(18) W. C. Frazier, Sanders, Boyer and Long. The bacteriology of Swiss cheese. I. Growth and activity of bacteria during manufacturing processes in the Swiss cheese kettle. *Journ. of Bact. 27* (1934) 539.

(19) W. C. Frazier, Burkey, Boyer and Sanders. II Bacteriology of cheese in the press. *Journ. of dairy Sci. 18* (1935) 373.

(20) E. von Freudenreich und Orla Jensen. Ueber die im Emmentalerkäse stattfindende Propionsäureregärung. *Landw. Jahrb. d. Schweiz,* 1906, 1.

(21) H. Hostettler. Die Anwendung der Gasanalyse zur Abklärung der Gärung im Hartkäse. *Landw. Jahrb, d. Schweiz.* 1932, 609.

(22) G. Koestler und H. Hostettler. Untersuchungen über die Natur des bei sog. „Nachgärungen" im Emmentalerkäse auftretenden Gases. *Landw. Jahrb. d. Schweiz,* 1931, 446.

(23) C. B. van Niel. The propionic acid bacteria. Diss. Delft 1928.

(24) Orla Jensen. Biologische Studien über den Käsereifungsprozesz unter spezieller Berücksichtigung der flüchtigen Fettsäuren. *Landw. Jahrb. d. Schweiz,* 1904. 319.

(25) J. Rodenkirchen. Die Propionsäurebakterien und ihr Vorkommen im Tilsiterkäse. *Milchw. Forsch. 19* (1937) 197.

(26) R. H. Shaw and J. M. Sherman. The production of volatile fatty acids and carbon dioxid by propionic acid bacteria with special reference to their action in cheese. *Journ. of dairy Sci. 6* (1923) 303.

(27) J. M. Sherman. The cause of eyes and characteristic flavor in Emmental or Swiss cheese. *Journ. of Bact. 6* (1921) 379.

(28) J. M. Sherman. The use of bacterial cultures for controlling the fermentation in Emmental cheese. World's dairy Congress 1924 I, 287.

(29) J. Thöni und O. Allemann. Ueber rote Punkte in Emmentalerkäsen. *Landw.* Jahrb. d. Schweiz, 1908, 46.