

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Aromavormers bij de roomzuring

DOOR

F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES.

(Ingezonden 16 Aug. 1919.)

Reeds lang is de aromavorming bij de boterbereiding een punt van onderzoek geweest. Zoo beschrijven STORCH, CONN, WEIGMANN, MAZS en anderen micro-organismen, welke zich onderscheiden door het doen ontstaan van een bepaalden geur in de er mede bereide boter. Een uitgebreide betekenis schijnen deze micro-organismen echter niet te bezitten, daar hun voorkomen zoo sporadisch is, doch zullen ze meer beschouwd moeten worden als op zich zelf staande gevallen. Algemeen echter zijn die, welke hier nader beschreven zullen worden.

Het zuursel, dat bij de boterbereiding gebruikt wordt voor het zuren van den room, heeft, wanneer het goed is, een eigenaardig frisch-zuren geur, welke moeilijk nader te omschrijven is, doch die voor den kenner opvallend is. Deze bijzondere geur nu wordt niet veroorzaakt door de melkzuurfermenten, welke in dergelijke roomzuursels voorkomen. Tevergeefs zal men daaronder naar een soort zoeken, die deze eigenschap heeft. Integendeel treft men dikwijls stammen aan, welke na het verzuren een branderigen geur en smaak aan de melk geven. Legt men van goed roomzuursel eene cultuur op weigelatine ¹⁾ aan en laat men deze cultuur ongeveer een week oud worden, dan treft men onder de koloniën er van verschillende grootte aan, welke, in melk gebracht, deze zelfs na verscheidene dagen zoo goed als niet in zuurgraad doen toenemen. Macroscopisch verandert de geente melk in het geheel niet; ook is er geen bepaalde geur aan waar te nemen. *doch wanneer men er vervolgens een melkzuurferment inbrengt, treedt na eenige dagen het eigenaardige aroma op.*

Aan de hand van deze gegevens is de isolatie der aromavormers betrekkelijk eenvoudig. Nadat de cultuur op weigelatine van

¹⁾ Weigelatine wordt door ons bereid als volgt: Goede versche melk wordt met leb gestremd, de wrongel met een mes eenigszins bewerkt en de wei afgegoten. Bij $\frac{1}{2}$ liter hiervan wordt 10 pct. gelatine gevoegd; na oplossing wordt de zure reactie tot amphoteer teruggebracht en de vloeistof $\frac{1}{2}$ uur in stoom verhit. Het ontstane neerslag wordt dan afgefiltreerd.

2095803

het roomzuursel ongeveer een week bij 21° C. gestaan heeft, brenge men eenige van de verschillende typen koloniën in kolfjes, welke 30 c.c. melk bevatten. Die, waarvan de melk na een vijftal dagen bij 21° C. niet verzuurd is, kunnen dan de aromavormers bevatten. Om deze kolfjes te schiften worden ze of geënt met een goed melkzuurferment, dat de melk in een tweetal dagen doet stremmen, of men ent er uit over in andere kolfjes met melk en brengt daarin tegelijk een goed melkzuurferment. Deze laatste manier heeft eenig voordeel, daar ze meer kans biedt de aromavormers te vinden. Van aroma is, als de melk gestremd is, echter nog niet veel te bemerken, doch wel een drietal dagen daarna, wanneer het begint op te treden. Uit de culturen, welke na dien tijd aroma verspreiden, kunnen nu de aromavormers geïsoleerd worden door daarvan wederom weigelatineplaten aan te leggen en van de opkomende kolonies die af te enten, welke melk niet verzuren.

Wat den vorm aangaat, zijn de aromavormers duplo- of streptococcon, doch komen ook groote streptococcon voor; de grootte varieert van 2,5 μ voor de duplococcon tot 8,75 μ voor een groote streptococcus van 4 individuen.

De groei op weigelatine is eenigszins langzaam. Na een 2-tal dagen beginnen de koloniën met de loupe zichtbaar te worden, doch ze bereiken eerst hunne volle grootte ongeveer 3 dagen later. De afmetingen loopen voor verschillende soorten bacteriën uiteen en gaan tot 1 m.M. toe; doch ook voor elke soort is de maat zeer verschillend, daar de bacteriën neiging hebben om weldra koloniën te vormen, die in grootte zeer wisselen.

Dit is dan ook waarschijnlijk de reden, waarom in culturen van boterzuursels de aromavormers in zoo'n verscheidenheid van koloniën optreden. De vorm der koloniën is soms rond, soms onregelmatig; de inhoud meest korrelig of meer of minder opaal. Hun aspect op weigelatine is verschillend, al naar men een plaat aanlegt van een reïncultuur in melk of van een mengcultuur der bacteriën met een melkzuurferment in melk; in het laatste geval zijn ze meerendeels veel grooter. In weigelatine treedt eveneens groei op, die echter eenigszins sneller schijnt te zijn. Hierbij is geen verschil op te merken of in diepe laag of anaerob gekweekt wordt. Na een tweetal dagen vertoonen de koloniën in beide gevallen zich reeds aan het bloote oog, terwijl ze na 5 dagen flink ontwikkeld zijn.

Op weigelatine, waaraan 0,1 pct. melkzuur is toegevoegd, ontstaat na een 4-tal dagen kolonievorming; wordt het melkzuurgehalte echter opgedreven tot 0,35 pct., dan blijft elke ontwikkeling uit.

Wat den invloed van de temperatuur betreft, zij op te merken, dat bij 21° en 25° C. goede groei optreedt, doch hogere temperaturen voor verschillende stammen minder gewenscht zijn. Van de door ons onderzochte aromabacteriën waren bijv. een tweetal niet tot ontwikkeling te brengen bij 31° C. in wei, welke

door een Chamberlandfilter gefiltreerd was geworden, terwijl dit spoedig gelukte als men de culturen daarna bij 21° C. plaatste.

De doodingstemperatuur werd bepaald door buisjes met steriele melk te enten, toe te smelten en gedurende 10 minuten onder te dompelen in water van verschillende temperatuur. Hierna werden ze 10 dagen lang geplaatst in een thermostaat van 21° C. Na dat tijdsverloop werden de buisjes geopend en streepculturen aangelegd op weigelatine. Het bleek daarbij, dat voor 2 soorten aromabacteriën bij 53½° C. nog groei optrad, doch niet meer bij 57° C., zoodat onder deze omstandigheden de doodingstemperatuur tusschen 53½° en 57° C. gelegen is.

Ten opzichte van diverse suikers is het gedrag der bacteriën verschillend. In neutraal vleeschaftreksel met ½ pct. pepton, waaraan was toegevoegd ½ pct. der enkelvoudige koolhydraten, dextrose, laevoluse of galactose, werd bij verschillende stammen alleen groei geconstateerd in de vloeistof met dextrose en galactose. Van de disachariden: lactose, maltose en sacharose vertoonde alleen de eerste ontwikkeling. Als koolstoffbron kunnen dus dextrose, lactose en galactose dienst doen; doch is de snelheid, waarmee de groei optreedt, niet voor al deze suikers gelijk, maar staat dextrose in dit opzicht bovenaan. Behalve dit bestaan er echter ook nog individueele verschillen. Zoo is voor sommige stammen de cultuuriele ontwikkeling in dextrose, galactose en lactose gelijk, terwijl bij anderen daarentegen in de vloeistof met de beide laatste suikers nooit een zoodanig intensieve ontwikkeling optreedt, als in die met dextrose. Wordt in plaats van vleeschaftreksel eene ½ percentige peptonoplossing in water met voedingszouten gebruikt, dan treden vrijwel dezelfde verschijnselen op; alleen is de groei zwakker of blijft hij soms ook wel uit, al naar de bacteriënstam is.

Vervangt men de pepton in dusdanige oplossing door ½ pct. ammoniumsulfaat, asparagine of ureum, dan blijft elke ontwikkeling uit, zoodat deze stoffen niet als stikstoffbron te gebruiken zijn.

Zooals reeds is medegedeeld, veroorzaken de aromabacteriën, op het oog geene veranderingen in melk. Zelfs wanneer de culturen weken achtereen in een thermostaat staan, treden geen zichtbare wijzigingen op. Bij onderzoek blijkt echter, dat er niettegenstaande dit toch chemische omzettingen hebben plaats gegrepen. Als voorbeeld daarvoor kan de volgende proef dienen.

Op 30 Maart 1917 werden kolven, waarin ½ L. centrifugemelk, gesteriliseerd en gewogen en na afkoeling geënt met afzonderlijke stammen van aromabacteriën; een tweetal blijven ongeënt, teneinde als contrôle dienst te doen. Alle kolven worden nu in een thermostaat geplaatst, waarvan de temperatuur loopt tusschen 30 en 32° C. Een maand later worden ze er uit genomen. Een verschil in aspect tusschen de geënte en niet geënte melk is niet te bemerken, ze zien er geheel gelijk uit, daarentegen is de smaak der eerste veel zoeter. Uit elk der kolven wordt een streepcultuur

op weigelatine aangelegd ter contrôle en daarna het gewicht, dat door de verdamping ongeveer een 20 gram achteruitgegaan is, door toevoeging van gedestilleerd water op het oorspronkelijke teruggebracht. Onderzocht volgens SCHEIBE op melksuikergehalte levert de niet geënte melk per 5 c.c. 343 mgr. koper, de geënte melk voor de verschillende stammen respectievelijk 410, 383 en 369 mgr. koper. De hoeveelheid koper, welke gereduceerd wordt, blijkt dus vrij sterk toegenomen, zoodat de aromabacteriën de melksuiker moeten invertieren. Van de mate, waarin dit geschiedt, kunnen de bovengenoemde getallen eenig idee geven. Bij inversie toch van 171 mgr. melksuiker tot 90 mgr. dextrose en galactose ontstaat bij de analyse een kopertoename, welke bedraagt $176 + 170 - 232$ of 114 mgr., daar deze getallen de hoeveelheden koper aangeven, welke door dit aantal mgr. suikers respectievelijk worden afgescheiden.

Wanneer nu de gevormde dextrose en galactose niet verder werden aangetast door de aromabacterie, dan zouden de gevonden toenamen aan koper, zijnde 410, 383 en 369 — 342 mgr. of 68, 41 en 27 mgr., overeenkomen voor het eerste getal met een hoeveelheid omgezette melksuiker van $\frac{68}{114} \times 171 = 102$ mgr., dus 107,4 mgr. melksuikerhydraat, welke geleverd had 53,7 mgr. dextrose en galactose ieder.

Bij de polarimetrische bepaling zoude men in dit geval, in verband met de specifieke draaiing, die voor melksuikerhydraat bedraagt $52,53^\circ$, voor dextrose $52,80^\circ$ en voor galactose $80,88^\circ$, een toename in draaiing moeten vinden van $18,4'$. Het bleek echter, dat de draaiing slechts $12'$ was vooruitgegaan, dus een verschil van $6,4'$ bestond.

Van de overige culturen, welke een verhooging in koperreductie van 41 en 27 mgr. aangaven, had de eerste dezelfde draaiing behouden als de oorspronkelijke melk, terwijl de tweede zelfs $2'$ was teruggelopen. Hieruit is dus op te maken, dat of de dextrose of de galactose of beiden aangetast worden onder deze omstandigheden. Behalve de inversie der melksuiker veroorzaken de aromabacteriën in melk ook nog een geringe zuurtoename, welke na \pm een maand 3 tot 6 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c. bedraagt. De waterstofionenconcentratie, electromotorisch gemeten, loopt daarbij op van $1,85 \times 10^{-7}$ voor de gesteriliseerde ongeënte melk tot $4,87$ à $5,24 \times 10^{-7}$ voor de geënte. Teneinde den aard van het zuur nader te bepalen werd 2 Liter van een ettelijke weken oude cultuur in het vacuum drooggedampt en het destillaat getitreerd. Na 3 weken bij kamertemperatuur was de totale hoeveelheid zuur, die overging 15 c.c. $\frac{1}{10}$ norm., na 5 weken bedroeg ze 21 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. Het genutraliseerde destillaat werd vervolgens wederom in vacuum tot droog toe ingedampt, het residu opgenomen in 110 c.c. water en deze oplossing volgens de methode DUCLAUX onderzocht. De daarbij verkregen destillatiegetallen toonden aan, dat *azijnzuur*

voorlag. Ongeënte gesteriliseerde melk, op dezelfde wijze behandeld, gaf, na een 3-tal weken gestaan te hebben, per 2 Liter slechts 0,5 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. zuur in het destillaat. De aromabacteriën vormen in melk dus azijnzuur, doch dat daarnaast ook nog andere niet-vluchtige zuren ontstaan, is zeer waarschijnlijk, in verband met de verhouding van de hoeveelheid zuur in het destillaat ten opzichte van dat in de melk gevormd.

Een tweetal culturen in centrifugemelk van verschillende stammen, welke ruim 5 maanden bij kamertemperatuur hadden gestaan, titreerden bijv.: 33,0 c.c. en 21,0 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c. Bij droogdampen in vacuo met toevoeging van wijnsteen zuur gingen per Liter over 62,9 en 39,9 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. azijnzuur, terwijl zonder toevoeging van wijnsteen zuur deze cijfers bedroegen 24,0 en 10,7 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. Neemt men het titergetal der oorspronkelijke centrifugemelk aan op 17 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c., dan is de zuurtoename in beide culturen 160 en 40 per Liter geweest en is dus in de eerste cultuur zeker ook niet-vluchtig zuur gevormd. Dat het azijnzuur grootendeels in gebonden toestand voorkomt, ligt voor de hand, waar melk als neutralisatiemiddel kan optreden.

Naast de inversie der melksuiker en het vormen van azijnzuur vertoonen de aromabacteriën ook nog een derde eigenschap. Wanneer namelijk culturen in melk, nadat ze minstens een maand bij 30° C. hebben gestaan, in stoom op 100° C. worden verhit; dan treedt er bij verschillende stammen na 10 minuten tot een uur stremming der vloeistof op. Deze coagulatie nu wordt niet veroorzaakt door het zuur, daar het titergetal der melk slechts 21 tot 24 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c. bedraagt en dus ligt beneden een zuurgraad, welke noodig is om onder die omstandigheden de melk te doen stremmen. Gedurende het stollen verandert de zuurgraad zoo goed als niet. Zoo was bij een 1 maand oude cultuur het titergetal vóór en na de verhitting 22 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c., terwijl dit voor dezelfde cultuur na 2 maanden bedroeg 24 en 23 c.c. Een andere cultuur vertoonde na 1 maand bij 32° C. gestaan te hebben, bij een zuurgraad van 20 c.c., het verschijnsel niet, doch wel na 2½ maand; de respectieve cijfers vóór en na het stollen waren toen 22 en 21 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c., terwijl de bij deze proef gebruikte melk ongeënt 17 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. titreerde. Ook is bij het coaguleeren geen verschil te bemerken in het oplosbaar kalkgehalte der melk. Zoo werd bij twee stammen in het serum der gestremde melk gevonden per 25 c.c. 13,7 en 13,6 mgr. CaO, terwijl de blanco melk 13,5 mgr. leverde. In verband met dit eigenaardig gedrag der oude culturen bij verhitting is onderzocht, in hoeverre de aromabacteriën de eiwitstoffen der melk aantasten.

Streepculturen aangelegd op weigelatine, waaraan 1,5 en 3 pct. steriele melk was toegevoegd of waarvan de oppervlakte met een dun laagje steriele melk bezet was, vertoonden in een viertal weken niet de minste oplossing der kaasstof. Ook langs chemischen

weg kon geene ingrijpende verandering in dit opzicht worden aangetoond. Na een maand toch was het totaal stikstofgehalte der geënte en niet-geënte melk hetzelfde gebleven; dit gold ook van het gehalte aan amido-verbindingen, ammoniak en peptonen.

Waar we in de aromavormers de eerst bekende representanten hebben van bacteriënsoorten, welke in staat zijn melksuiker te invertieren, zoo is omtrent dit vermogen nog een eenigszins nader onderzoek ingesteld geworden. Eerstens is nagegaan of een verhooging van den zuurgraad de inversie zoude bespoedigen. Daartoe werden kolven met 500 c.c. centrifugemelk, waaraan 5 c.c. $\frac{1}{2}$ norm. melkzuur was toegevoegd, geënt met afzonderlijke stammen. Na ruim twee maanden werd de toename in reductievermogen der melk bepaald. De hoeveelheid koper, welke toen door de geënte melk werd neergeslagen, beliep per 5 c.c. 12, 13,5 en 22,5 mgr. Cu meer dan voor de blanco melk. Onder deze omstandigheden was dus van een gunstigen invloed van het zuur niet veel te bemerken, daar de vroeger genoemde cijfers (zie blz. 4) hooger liggen.

Verder werd onderzocht of de zuurstofspanning van invloed was bij de inversie. Daarom werd gekweekt in diepe en ondiepe laag. Voor het eerste zijn kolven van 700 c.c. inhoud, gevuld met 500 c.c. centrifugemelk, geënt met afzonderlijke stammen. Na 38 dagen bedroeg de toename in reductie per 5 c.c. melk voor elk der twee stammen 12 en 23,5 mgr. Cu. De zuurgraad voor de blanco melk was 20,0 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c.; voor de geënte melk telkens 23,0 c.c. $\frac{1}{10}$ norm.

Het kweeken in ondiepe laag geschiedde in Erlenmeyerkolven van \pm 500 c.c. inhoud, waarin \pm 100 c.c. centrifugemelk gebracht was. Als entmateriaal werden dezelfde stammen gebruikt als bij de vorige proef. Nadat de culturen 38 dagen oud waren, wees in dit geval de hoeveelheid koper, welke neersloeg, eene vermeerdering aan van 29,5 en 30,5 mgr., terwijl de zuurgraad, welke voor de contrôlemelk 17 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c. bedroeg, voor de culturen 21 en 22 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. was.

Waar dus voor de culturen in ondiepe laag een eenigszins sterkere inversie op te merken valt dan voor die in een diepe laag, zoo kan daaruit afgeleid worden, dat een ruime zuurstof-toetreding voor deze bepaalde levensuiting der aromabacteriën eenigszins bevorderlijk is.

Evenals in melk treedt de inversie ook in wei op. Zoo was na één maand de reductie-toename in door een Chamberlandfilter gesteriliseerde wei 16 en 11 mgr. koper per 5 c.c. vloeistof voor een tweetal afzonderlijke stammen. In vleeschaftreksel met $\frac{1}{2}$ pct. pepton, waaraan 5 pct. melksuiker is toegevoegd, gedragen de aromabacteriën zich echter anders. Na een week bij 25° C. gestaan te hebben, vertoonden de culturen tegenover de blanco-proef een afname van 22,5, 20,5 en 7,5 mgr. koper per 5 c.c. vloeistof. Toen de culturen 2 weken oud waren, was deze afname voor 2 stammen teruggebracht tot respectievelijk 12 en 2 mgr.,

terwijl de derde nu een toename van 12 mgr. had. Veertien dagen later waren deze cijfers 18, 2,5 mgr. en de toename afgezaakt tot 3,5 mgr., terwijl bij 2 maand oude culturen wederom voor allen een afname te constateeren viel ten opzichte van de blanco proef van 28,5, 7,5 en 5,5 mgr. De aromabacteriën veroorzaken dus in deze vloeistof eerst een vermindering in suikergehalte, daarna komt een periode, waarin het verschil kleiner wordt of het oorspronkelijk reductiegetal wordt overschreden, dus feitelijk voor allen een toename plaats grijpt; daarop volgt weer een inzinking, welke zich langzaam voortzet.

Het bepalen van het melksuikergehalte in dergelijke vloeistoffen met pepton kan niet geschieden volgens SCHEIBE. Het neerslaan der eiwitstoffen met kopersulfaat levert dan geen resultaat op en er ontstaat bij toevoeging der Fehlingsche oplossing geen praecipitaat van Cu_2O , doch heeft alleen een geele verkleuring plaats. Wij gebruikten daarom phosphorwolframzuur als praecipitiemiddel. Aan 10 c.c. der vloeistof werden 5 druppels verdund zwavelzuur (1 : 4) toegevoegd en 0,600 gram phosphorwolframzuur, dat tevoren in weinig water was opgelost. Vervolgens werd aangevuld tot 100 c.c., en 50 c.c. van het gewoonlijk iets opaliseerend filtraat met NaOH alcalisch gemaakt, waarbij de vloeistof helder wordt. Dan werd 100 c.c. Fehlingsche oplossing bijgeschonken en verder op de gewone wijze behandeld.

Over den invloed der temperatuur op het reductievermogen der culturen geeft de onderstaande proef eenig licht. In wei, welke door een Chamberlandfilter gegaan was, trad bij 31°C . voor een stam der aromabacteriën een reductietoename op van 35 mgr. Cu per 5 c.c. Diezelfde stam leverde bij 21°C . echter een toename van slechts 4 mgr. of $\pm \frac{1}{3}$, van die bij 31°C . In melk treedt een dergelijk verschijnsel op. Bij 31°C . gaven drie stammen een verhooging in gewicht aan koper van respectievelijk 60, 36 en 29 mgr.; terwijl deze verhooging voor dezelfde stammen in dezelfde melk bij 21°C . bedroeg voor twee er van 40 en 21 mgr. en de derde een vermindering had van 5 mgr. Het verschil van 10°C . in temperatuur had dus tengevolge een afname van 20, 15 en 34 mgr. We zien dus het eigenaardig verschijnsel, dat terwijl bij 31°C . in alle culturen een inversie der melksuiker valt te constateeren, deze inversie bij 21°C . geringer is of soms uitblijft. Waarschijnlijk zal dit echter wel een schijnbaar verschil zijn. Feitelijk toch heeft men in levende culturen in dit opzicht te maken met twee factoren, te weten het invertteerend enzym aan den eenen kant en het opnemen van suiker door de bacteriën aan den anderen kant. Het hangt er nu maar van af, welke van deze twee factoren onder de gegeven omstandigheden het grootst is. Overheerscht de inversie, dan wordt een toename aan gereduceerd koper gevonden; is de suikerabsorbtië daarentegen grooter, dan neemt de hoeveelheid koper af. Zijn beide factoren even machtig, dan blijft het reductiegetal constant. Hierin zal ook wel de verklaring

gezocht moeten worden van het eigenaardig gedrag der aromabacteriën in vleeschaftreksel met pepton en melksuiker. Dat in dit voedingsmedium werkelijk een enzym ontstaat, dat melksuiker invertiert, kon op de volgende wijze aangetoond worden. Eenige culturen, welke 1 maand oud waren, werden door een steriel Chamberlandfilter gefiltreerd en het beslag, dat zich daarbij op de kaars vormde, door middel van een borsteltje, met aceton bevochtigd, afgenomen. Na eenige malen te zijn uitgewassen met aceton, werd de stof aan de lucht gedroogd, vervolgens fijn gewreven in een mortier en daarna gebracht in 100 c.c. van een ruim 5 pct. melksuikeroplossing in water, waaraan 2 c.c. chloroform was toegevoegd. De Erlenmeyerkolfjes met de oplossing werden bij 25° C. geplaatst en een 19-tal dagen later onderzocht, nadat ze eerst op het oorspronkelijk gewicht waren teruggebracht ¹⁾. Het aantal milligrammen gereduceerd koper, dat bij de vloeistof als zoodanig per 5 c.c. 318 bedroeg, steeg in dien tijd in het kolfje met de stof tot 333, nam dus met 15 mgr. toe.

Een herhaling der proef gaf een kleiner verschil namelijk van 7 mgr. Dat we hier te doen hebben alleen met een endo-enzym is door deze proef niet geheel en al vast te stellen, daar het beslag op de Chamberlandkaars achtergebleven naast bacteriëncellen ook geadsorbeerd ecto-enzym kan bevatten. Ten einde dit uit te maken zijn van eenige culturen der aromabacteriën in wei, nadat deze één maand oud waren, de bacteriën door middel van een Chamberlandkaars afgefiltreerd en is het filtraat verdeeld over enkele kolfjes met wat chloroform, wederom één maand bij 31° C. gezet. Als blanco dienden een paar kolfjes, waarin de vloeistof van te voren opgekookt was geworden. Na afloop van dien tijd werden de kolfjes op het oorspronkelijke gewicht teruggebracht met gedestilleerd water en het reductievermogen bepaald. Dit was echter voor het gekookte, zoowel als voor het niet verhitte filtraat hetzelfde gebleven, zoodat daaruit mag besloten worden, dat een ecto-enzym hoogstwaarschijnlijk ontbreekt, aangezien adsorbtie door het filter mogelijk is.

Een herhaling der proef leverde hetzelfde resultaat.

Na dit overzicht van de biologische werkingen der aromabacteriën is thans de vraag te stellen, waaraan het aroma is toe te schrijven en hoe het tot stand komt. Dat de samenwerking noodig is van melkzuurbacteriën met aromavormers is alreeds medege-deeld, doch er blijven een tweetal mogelijkheden over; of de aromabacteriën vormen het aroma uit de stofwisselingsproducten der melkzuurfermenten, of omgekeerd deze laatste doen het ontstaan uit de splitsingsproducten der eerste. Ten einde na te gaan wat juist was, werden eerstens culturen van een goed virulent melkzuurferment in melk, die eenige dagen oud waren en dus gestremd, eenigen tijd op 100° C. verhit en na afkoeling geënt

¹⁾ Bij het begin der proef waren de kolfjes gewogen vóór de toevoeging van de chloroform. Deze verdampde geheel gedurende het verblijf in de thermostaat.

met aromabacteriën. Daar echter aroma uitbleef, werd de proef omgekeerd en culturen in melk van verschillende aromabacteriën, welke 18, 27 en 31 dagen bij 20° C. en 30° C. gestaan hadden; na een verhitting van 10 minuten op 100° C. en opvolgende afkoeling geënt met het melkzuurferment. Een vijf tot achttal dagen daarna trad zonder onderscheid *aroma* op. De smaak was eveneens naar aroma, doch zoetig. Vooral wanneer centrifugemelk gebruikt werd, slaagde de proef goed; bij volle melk toch ontstaat in dergelijke culturen een bijreuk door de oxydatie van het vet, die op den langen duur optreedt. Hiermede was dus aangetoond, *dat de aromabacteriën in melk stoffen doen ontstaan, waaruit de melkzuurfermenten aroma te voorschijn roepen.*

Er werd nu getracht uit te vinden, welk gedeelte der melk indirect de oorzaak was der aromavorming, te weten de eiwitstoffen of de melksuiker.

Dat de melksuiker, dat is te zeggen in geïnverteerden toestand, niet daaraan deelnam, bleek wel daaruit, dat in melk met ½ pct. dextrose of galactose, of met ½ pct. van beide suikers, door het melkzuurferment na verloop van 6 tot 8 dagen geen aroma noch aromatische smaak ontstond.

Aan de hand van dit negatief resultaat is dus aan te nemen, dat de onopgeloste eiwitstoffen, na omzetting door de aromabacteriën, het werkelijk agens zijn. Een steun voor deze opvatting is te vinden in het volgende. Wanneer uit melk deze eiwitstoffen door middel van een Chamberlandkaars afgefiltreerd zijn en het serum geënt wordt met een aromabacterie en het melkzuurferment, dan ontstaat na 12 dagen geen aroma, ook niet al voegt men caseïnepepton toe. Hetzelfde verschijnsel treedt op, als in plaats van melk, culturen van aromabacteriën in melk, welke 26 dagen tot 1 maand oud zijn, gefiltreerd worden. Ook in het serum daarvan is zelfs na 14 dagen na enting met het melkzuurferment geen aroma te constateeren. In overeenstemming hiermede is, dat in vleeschaftreksel met ½ pct. pepton, waaraan ½ pct. lactose, dextrose of galactose is toegevoegd, geen aroma ontstaat.

Het directe bewijs bij te brengen, dat de eiwitstoffen de bron zijn voor de aromavorming, daarin zijn wij tot dusver niet geslaagd. Wanneer toch caseïne in oplossing werd gebracht met kalkwater of natronloog, met al of niet neutraliseeren door phosphorzuur en men voegde voedingszouten en 5 pct. melksuiker toe, dan ontstond nooit aroma bij enting. Het was hierbij hetzelfde of de kaasstof bereid was uit versche melk of uit culturen in melk der aromabacteriën en dan in het laatste geval alleen met het melkzuurferment geënt werd. Een bezwaar van deze oplossingen is echter, dat bij het steriliseeren de caseïne in meer of mindere mate neerslaat en daardoor onttrokken wordt aan de inwerking der bacteriën. Nu is het te ondervangen door gelijke deelen melk en oplossing te nemen, welk mengsel bij het steriliseeren onveranderd blijft, doch men is dan uit den aard der zaak in zooverre gebonden, dat alleen kan geëxperimenteerd worden

met kaasstof, afkomstig uit aromaculturen en de enting slechts met een melkzuurferment alleen kan geschieden. Proeven in deze richting genomen hebben nochtans geen ander resultaat opgeleverd dan de vorige. Achttien dagen na de enting was ook daar geen aroma te bemerken.

Misschien zal het niet slagen van deze experimenten moeten toegeschreven worden aan geringe wijzigingen, welke het eiwitmolecuul ondergaat bij de chemische behandeling, noodig voor de bereiding en oplossing van de caseïne.

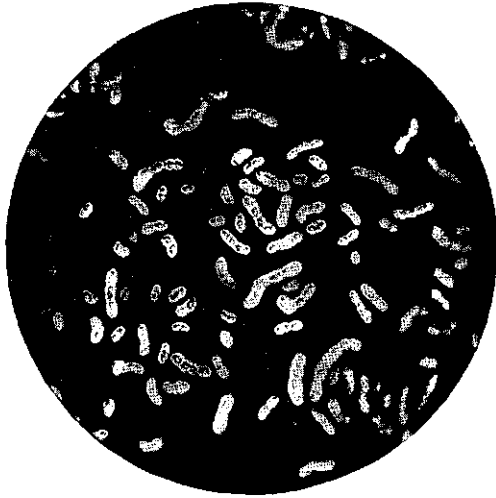
Waar toch de verandering, welke de aromabacteriën in de kaasstof te voorschijn roepen, zich alleen maar openbaart in een stolling bij verhitting op 100° C. en verder elke chemische aanwijzing ontbreekt, zoo blijkt wel, dat het hierbij om omzettingen gaat, welke chemisch gesproken gering zijn. Dat door een kleine afwijking in den bouw van het eiwitmolecuul, zooals dat in melk voorkomt, aromaontwikkeling buitengesloten wordt, is waarschijnlijk niet onmogelijk.

Zooals gezegd is voor het tot standkomen van aroma de samenwerking noodig van aromabacterie en melkzuurferment. Het is echter niet onverschillig, welke soort melkzuurbacterie genomen wordt, daar er onderling groote verschillen kunnen optreden. Van een vijftal stammen aromabacteriën onderzochten we de verhouding ten opzichte van een drietal soorten melkzuurfermenten, welke ieder voor zich virulent waren en de melk niet de minste onaangename reuk of smaak bijbrachten. Drie van de vijf aromabacteriën nu gaven een goed resultaat met alle drie melkzuurfermenten, terwijl de overige twee stammen slechts met één er van een goede combinatie vormde; voor beide was dit hetzelfde melkzuurferment.

Behalve dat de melkzuurfermenten bij aanwezigheid der aromabacteriën uit de daardoor gevormde stoffen aroma vormen, wordt in een mengcultuur van beide micro-organismen in melk ook nog het gehalte aan vluchtig zuur vrij sterk verhoogd. Zoo werd uit 2½ L. van een dergelijke 4 dagen oude cultuur bij droogdampen in vacuo een destillaat verkregen met een totale hoeveelheid van 212 c.c. $\frac{1}{10}$ norm., terwijl eenzelfde hoeveelheid cultuur, 5 dagen oud, van het melkzuurferment alleen, slechts 27 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. leverde. Volgens de methode DUCLAUX onderzocht, bleek het zuur in beide gevallen azijnzuur te wezen.

Worden de culturen ouder, dan loopt het gehalte aan vluchtig zuur sterk terug. Zoo bedroeg dit voor de geheel gelijke mengcultuur in dezelfde melk na ruim 2 maanden nog slechts 85 c.c. $\frac{1}{10}$ norm., terwijl het melkzuurferment voor zich 24 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. leverde. In dien tijd was dus het gehalte aan azijnzuur verminderd met 127 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. voor de mengcultuur, terwijl de cultuur van het melkzuurferment slechts met 3 c.c. afnam.

Dat de toename van de azijnzuurproductie niet alleen wordt veroorzaakt door de aromabacterie, blijkt wel daaruit, dat deze alleen niet tot een dergelijke hoeveelheid komt. Zoo leverde



per 2 L. melk een zes dagen oude mengcultuur 140 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. azijnzuur, het melkzuurferment 24 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. en de aromabacterie onder toevoeging van wijnsteenzuur bij de destillatie 70 c.c. $\frac{1}{10}$ norm., zoodat in de mengcultuur 46 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. azijnzuur meer werd verkregen dan de som bedraagt.

Plaatverklaring.

De photo's stellen voor aromabacteriën van een tweetal verschillende stammen bij 1000 \times vergrooting. Tusche methode met collargol.

Aromabildner bei der Rahmsäuerung.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen.)

Im Gegensatz zu den bisher bekannten Aromabildnern, welche keine allgemeine Bedeutung besitzen, sind die hier beschriebenen weit verbreitet in den guten holländischen Rahm-Säure-weckern. Reinkulturen dieser Aromabakterie in Milch erhalten durch Abimpfen von eine Woche alter Molken-gelatine-kultur eines Rahmsäure-weckers, ändern die Milch augenscheinlich nicht, bilden aber nach einigen Tagen bei 21° das eigentümliche Aroma, wenn gewöhnliche Milchsäurefermente zugesetzt werden. Sie bestehen aus Duplo- und Streptococcen (jeder coc miszt etwa 1—2 μ) und wachsen auf Molkengelatine in sehr verschiedener Kolonieforn jenach der Varietät; anaerob ist ihr Wachstum auch recht gut. Kleinere Mengen Milchsäure werden ertragen; für grösseren, z.B. 0,35 pct. sind sie empfindlich. Der Optimum-temperatur liegt bei etwa 21° C., einige Varietäten entwickeln sich nicht mehr bei 31° C.; die Tötungstemperatur, bestimmt durch 10 Minuten erhitzen, liegt zwischen 53½—57° C.

In Löfflersche Bouillon ohne Zucker wachsen die Bakterien nach Zusatz von Dextrose, Galactose oder Lactose; die Wachstumsintensität in diesen Medien hängt in hohem Grade zusammen mit der Varietät. Einfache Stickstoffverbindungen sind ungeeignet für Stickstoffquelle. Nachgewiesen wurde dasz die Reinkulturen in Milch die Laktose teilweise umsetzen in Dextrose und Galactose, durch Zunahme der Kupferreduktion; der Drehung vermehrte sich nur bisweilen. Die Säureproduktion ist sehr gering und besteht nach der Duclauxmethode untersucht aus Essigsäure und ausserdem aus geringen Quantitäten nicht flüchtiger Säure. Eine dritte Umänderung in der Milch hervorgerufen durch diese Bakterie zeigt sich durch langwährige Erhitzung auf 100° C. Durch teilweise Umsetzung der Eiweisskörper tritt Gerinnung ein, ohne dasz der sehr niedrige Säuregrad sich ändert; chemisch konnte aber kein Umsatz des Eiweisses nachgewiesen werden.

Näher wurden die Faktoren studirt, welche die Inversion des

Milchzuckers beeinflussen können; Milchsäurezusatz wirkt nicht begünstigend, Sauerstoffzufuhr dagegen einigermaßen vorteilhaft.

Die Inversion findet auch in durch Chamberland-Kerze sterilisierter Molke statt; weniger intensiv ist dieselbe in Fleischbrühe mit $\frac{1}{2}$ pct. Pepton und 5 pct. Milchzucker. Die Bestimmung des Milchzuckers in peptonhaltiger Lösung wurde ausgeführt nach Klärung mit Phosphorwolframsäure nach schwacher Ansäuerung mit Schwefelsäure. Die Inversion konnte bei 31° C. besser konstatiert werden als bei 21° C., wahrscheinlich weil die Aufnahme und Zersetzung des Zuckers durch die Bakterien bei hoher Temperatur weniger intensiv vor sich geht.

Die Bildung eines invertierenden Fermentes konnte in alten Kulturen nachgewiesen werden durch Filtration mittels einer Chamberland-kerze und Auswaschen des Niederschlages mit Aceton. In sterilen 5 pct. Milchzuckerlösungen mit 2 pct. Chloroform entstand bei 25° C. eine Zunahme der Reduktionsfähigkeit durch Zusatz dieses Niederschlages. Das Filtrat der alten Kulturen enthält kein invertierendes Enzym, wahrscheinlich liegt also ein Endoenzym vor, wenn nicht das Enzym durch das Chamberlandfilter adsorbiert wird.

Das Aroma wird von den Milchsäurefermenten gebildet aus den Abbauprodukten der Aromabakterien, weil die ersten Aromageben in abgetöteten Milchkulturen der letzten und nicht umgekehrt. Der invertierte Milchzucker ist nicht die Ursache der Aromabildung sondern die ungeänderten Eiweisskörper. Frisches Chamberland-Milchserum geimpft mit beiden Kulturen giebt nie Veranlassung zur Aromabildung, ebensowenig das Milchserum einer Aromabildnerkultur, wenn man dieses mit Milchsäurefermenten impft. Es gelang aber nicht den direkten Nachweis zu liefern, dass die Eiweisskörper die Brunnen der Aromabildung sind. Künstliche Nahrungslösungen mit gefälltem Käsestoff, welcher wiederum in Lösung gebracht wurde, stammend von gewöhnlicher Milch oder Aromakulturen in Milch lieferten nie Aroma mit Milchsäurebakterien, vielleicht durch die Zersetzung, welche das Eiweiss erleidet bei der Behandlung zur Fällung und Lösung. Die verschiedenen Stämme der Milchsäurefermente und Aromabildner passen nicht immer zu einander, einige Kombinationen lieferten keine Aromabildung. Die Symbiose dieser beiden Bakterienarten giebt nicht nur Veranlassung zur Entstehung von Aroma sondern gleichzeitig wird eine ziemlich grosse Menge flüchtige Fettsäure gebildet. Diese Fettsäure ist Essigsäure wie mit der Methode DUCLAUX nachgewiesen wurde. Die Menge Essigsäure ist bedeutend grösser wie die Summe der Mengen Essigsäure in den Kulturen der einzelnen Bakterienarten.