

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

Het gebrek „knijpers" In Edammer kaas.

DOOR

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

In deze verslagen, N^o. XIV 1913, deelden we onze proeven mede over den invloed, welke het toevoegen van salpeter aan de kaas uitoefent op dit gebrek en constateerden, dat *in alle gevallen waar kalisalpeter was toegevoegd, het gebrek uitbleef, terwijl als het kaliumnitraat ontbrak altijd een knijper ontstond.* Waarom, ondanks de geconstateerde gunstige werking, in de praktijk soms geen invloed van de salpeter te bespeuren viel, verklaarden we als volgt: „Bij de proefkazen hadden we te maken met eene infectie door het boterzuurferment alleen, wat in de praktijk niet het geval is. Daar vormen de boterzuurfermenten uit den aard der zaak slechts een onderdeel van de totale besmetting en nu hangt het van de samenstelling der bacteriënflora van die besmetting af, of de salpeter al dan niet zal kunnen ingrijpen. Daar het gebrek eerst na ongeveer 10 à 14 dagen optreedt, moet de salpeter al dien tijd intact in de kaas voorkomen, zal ze op het juiste tijdstip aanwezig kunnen zijn; wordt ze echter vóór dien tijd vernietigd, dan spreekt het vanzelf, dat dan de gunstige invloed er van uitblijft. Onder de bacteriën, welke in staat zijn salpeter aan te tasten, behoort, zooals bekend, de coli-commune, die de rijzing in kaas veroorzaakt, tegen welk gebrek eveneens het gebruik van kaliumnitraat wordt aangewend, zooals we in 1904 mededeelden. Dit wordt spoedig door de bacterie geheel ontleed eerst tot nitriet, terwijl ook deze verbinding door verdere inwerking uiteen valt.

Worden er dus naast boterzuurfermenten ook colicommune in virulenten toestand door toevallige besmetting in de melk gebracht, dan zal de salpeter na korten tijd niet meer in de kaas voorkomen en is eene gunstige inwerking op de boterzuurfermenten buitengesloten. Op deze wijze kan dus verklaard worden, waarom het middel in de praktijk soms faalt."

De volgende proeven nu hebben het doel gehad na te gaan of

2095529

deze verklaring de juiste was, of dus met andere woorden de aanwezigheid van coli-commune den invloed der kalisalpeteer kon uitschakelen. Het hierbij gebruikte boterzuurferment werd geïsoleerd uit een „knijper”, welke we verkregen door tusschenkomst van den Rijksszuivelconsulent voor Noord-Holland. De kaas was ruim twee maanden oud, toen we haar op 21 Juli 1915 ontvingen, had eene flinke tot de korst doorlopende scheur en was gemaakt op eene boerderij.

De isolatie van de bacterie geschiedde op de vroeger beschreven wijze.

Van de buisjes, welke op 22 Juli 1915 met deze kaas geënt waren ¹⁾, vertoonden eenigen gisting op 31 Juli. Ze bevatten beweeglijke staven, terwijl de vloeistof naar boterzuur reikte. Op 2 Augustus was de inhoud van nog eenige buizen in gisting geraakt en werden daarvan op 5 Augustus culturen aangelegd in neutrale Löffl. gelatine met ½ pct. galactose. Hierin kwamen 3 dagen later reeds koloniën op en ontstonden gasblazen. Op 13 Augustus werden de koloniën overgeënt in buisjes met de bouillon, waarin na 10 tot 15 dagen gisting optrad. Uit de buisjes hiervan, welke 23 Augustus groei vertoonden, werden gelatine-culturen aangelegd van het boterzuurferment en deze voor de proeven gebruikt.

Alvorens van het boterzuurferment af te stappen, willen we er nog even op wijzen, dat overentingen daarvan in de bouillon het best schijnen te slagen, wanneer sporenhoudend materiaal gebruikt wordt. Vandaar is het geraden niet direct uit de op 80° C. verhitte buisjes over te enten in bouillon, doch eerst gelatineculturen, waarin de sporenvorming vrij spoedig plaats grijpt, aan te leggen en de koloniën, als deze een paar weken oud zijn, dus reeds sporen bevatten, als entmateriaal te gebruiken. Behalve voor de isolatie van het boterzuurferment, is de „knijper” ook nog gebruikt om na te gaan welke vluchtige vetzuren in dergelijke kazen voorkomen. Daartoe is de kaas, van haar korst ontdaan, fijngemalen en met water tot een dunne pap aangewreven. Het volume bedroeg toen goed 3 liter. Na toevoeging van 20 gram wijnsteenzuur is deze pap in een vacuum tot droog toe afgedestilleerd, en het destillaat getitreerd en ingedampt. Nadat de vloeistof aangevuld was tot 120 c.c. en met wijnsteenzuur zuur gemaakt, werden daarin volgens de methode Duclaux de vluchtige vetzuren bepaald, met dien verstande, dat eerst 10 c.c. werden afgedestilleerd om eventueel aanwezig koolzuur te verwijderen.

Nevenstaande tabel geeft de cijfers op deze wijze verkregen.

1) Pl. m. 10 gram der kaas werd daartoe in een steriel mortier met 10 c.c. physiologische keukenzoutoplossing aangewreven en van deze pap met een groot platina oeg pl. m. ½ gram in het buisje gebracht.

10 c.c.	Titergetal in c.c. $\frac{1}{10}$ norm.	Titergetal in pct. van de totale hoeveelheid gedestilleerd zuur.	
1e	11,7	10,5	Het destillaat riekte sterk naar boterzuur.
2e	22,4	20,1	
3e	33,2	29,8	
4e	43,2	38,8	
5e	53,3	47,9	
6e	63,2	56,8	
7e	73,6	66,1	
8e	84,0	75,5	
9e	96,1	86,3	
10e	111,3	100,0	

De in de kolf resteerende 10 c.c. werden opnieuw op 110 c.c. gebracht en leverden wederom afgedestilleerd de titergetallen voor *azijnzuur*. Het bleek dus, dat het in de kaas voorkomend vluchtig zuur is een mengsel van *azijnzuur* en *boterzuur*. De gezamenlijke quantiteit, waarin deze zuren globaal in den „knijper” voorkwamen, leverde de titer van het in vacuo verkregen destillaat, dat in dit geval 149 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. bedroeg. Hierbij dient echter niet te worden vergeten, dat op deze wijze de vluchtige vetzuren niet quantitatief overgaan en dus alleen benaderende getallen gegeven kunnen worden.

Volgens de tabellen van Duclaux (Annales de l'Institut Pasteur 1895, blz. 278) komen de getallen het meest overeen met die, welke een mengsel van 1 deel boterzuur en 3 deelen *azijnzuur* oplevert, zoodat de „knijper” globaal bevat zoude hebben $\frac{149}{4} \times 8,8$ mgr. = 0,328 gram boterzuur en $\frac{149}{4} \times 3 \times 6$ mgr. = 0,6705 gram *azijnzuur*.

Van deze beiden is het *azijnzuur* wel grootendeels, zoo niet geheel, gevormd door de in de „knijper” aanwezige melkzuurbacteriën, daar het boterzuurferment dit zuur niet schijnt te produceeren. Hoewel door dit laatste, volgens de destillatiegetallen, verkregen bij toepassing der Duclauxsche methode op reïnculturen, naast het boterzuur nog één of meer andere zuren gevormd worden, zoo is het ons niet gelukt daarin *azijnzuur* aan te toonen.

Naast het uit den „knijper” geïsoleerde boterzuurferment moesten bij de proeven ook nog gebruikt worden bacteriën, welke in staat waren de toegevoegde kalisalpete te reduceeren. Daartoe werd behalve de coli-commune ook genomen bacterium lactis-

aerogenes, een bacterie, welke evenals coli-commune aanleiding kan geven tot rijzing. In de praktijk treedt dit micro-organisme echter veel minder op den voorgrond dan laatstgenoemde, zoodat in verreweg de meeste gevallen in „rijzers” alleen coli wordt gevonden.

Een „rijzer” uit de praktijk, welke ons ter onderzoek werd gezonden, bleek toevallig beide soorten te bevatten en kwamen we daardoor in het bezit van een goed virulente coli-commune en lactis-aerogenes stam, welke in staat waren melksuiker flink aan te tasten.

Met deze verschillende bacteriën zijn dan de volgende proeven genomen, waarbij wat het boterzuurferment betreft, culturen in neutrale Löfflersche gelatine met $\frac{1}{2}$ pct. galactose werden gebruikt; terwijl van de coli-commune en bacterium lactis-aerogenes culturen op weigelatine genomen werden.

Met het oog op het koudere jaargetijde, waarin het onderzoek plaats greep, zijn verder de kazen teneinde de bacteriëngroei te bevorderen, bewaard in eene ruimte, welke kunstmatig verwarmd werd.

18 October 1915. Gemaakt van 48 K.G. mengmelk der proefboerderij. 2 kazen gemerkt PR en C.

De melk voor PR bevatte:

$\frac{1}{2}$ cultuur (\pm 4 c.c.) van het boterzuurferment,

1 cultuur van coli-commune,

1 cultuur van lactis-aerogenes,

25 c.c. z.g. reïncultuur (cultuur van een melkzuurferment in melk, in de praktijk bij de kaasbereiding in gebruik),

$7\frac{1}{2}$ gram kalisalpeter.

De melk voor C bevatte:

de andere helft der cultuur van het boterzuurferment,

25 c.c. reïncultuur.

Als contrôle diende eene kaas der proefboerderij, welke uit dezelfde melk was gemaakt, terwijl reïncultuur en hetzelfde kaas-kleursel en stremsel gebruikt waren.

Op 1 November 1915 werd kaas C opengesneden. Ze had een 4-tal groote scheuren, 4 c.M. lang, loopend vanaf de korst en in het midden veel groote gaten, was dus knijperig.

Kaas PR, welke elf dagen later werd doorgesneden, was een knijper geworden. *Salpeter was niet meer aanwezig.*

De contrôlekaas werd op 28 December onderzocht en bleek goed te zijn.

19 October 1915. Gemaakt uit 48 K.G. mengmelk der boerderij 2 kazen gemerkt PRI en CI.

De melk voor PRI bevatte:

$\frac{1}{2}$ cultuur (\pm 4 c.c.) van het boterzuurferment,

1 cultuur van coli-commune,

1 cultuur van lactis-aerogenes,

$7\frac{1}{2}$ gram kalisalpeter,

25 c.c. reïncultuur.

De melk voor CI bevatte:

de andere helft der cultuur van het boterzuurferment,
25 c.c. reincultuur.

A is een contrôlekaas uit dezelfde melk gemaakt op de boerderij, waarbij gebruikt waren hetzelfde kaaskleursel en stremsel en reincultuur was toegevoegd.

Op 12 November 1915 werden de beide proefkazen doorgesneden.

PR1 was *knijperig* geworden, terwijl *salpeter* afwezig bleek te zijn.

CI was eveneens knijperig en had inwendig groote gaten.

De contrôlekaas A, welke 26 December werd onderzocht, had eenige boekelscheuren.

21 October 1915. Gemaakt van 48 K.G. mengmelk der boerderij 2 kazen gemerkt PR 3 en C 3.

De melk voor PR 3 bevatte:

$\frac{1}{2}$ cultuur van het boterzuurferment,
1 cultuur van coli-commune,
1 cultuur van lactis-aerogenes,
 $7\frac{1}{2}$ gram kalisalpeter,
25 c.c. reincultuur.

De melk voor C 3 bevatte:

de andere helft der cultuur van het boterzuurferment,
25 c.c. reincultuur.

D is een contrôlekaas uit dezelfde melk gemaakt op de boerderij, waarbij gebruikt waren hetzelfde kaaskleursel en stremsel en reincultuur was toegevoegd.

Van de proefkazen werd C 3 opengesneden op 1 November; PR 3 op 12 November 1915.

De eerste had een paar, 4 c.M. lange scheuren, loopend vanaf de kost en in het midden verschillende groote gaten, was dus knijperig.

PR 3 was een *knijper*, waarvan de scheuren aan de rand lagen en had inwendig eveneens groote gaten. *Salpeter* was afwezig.

De contrôlekaas D werd doorgesneden op 28 December 1915 en was normaal.

22 October 1915. Gemaakt van 24 K.G. mengmelk der boerderij een kaas gemerkt PR 4.

Aan de melk was toegevoegd:

$\frac{1}{2}$ cultuur van boterzuurferment,
1 cultuur van coli-commune,
1 cultuur van lactis-aerogenes,
 $7\frac{1}{2}$ gram kalisalpeter,
25 c.c. reincultuur.

Als contrôlekaas diende een kaas E, welke uit dezelfde melk was gemaakt op de boerderij, met gebruik van hetzelfde kleursel en stremsel en toevoeging van reincultuur.

Op 2 November 1915 werd PR 4 doorgesneden. Er waren aan den rand 5 scheuren van 4 à 5 c.M. lengte en in het middenge-

deelte gaten; ze was dus *knijperig*. *Salpeter kwam er niet meer in voor*.

E. bleek bij het onderzoek op 28 December, toen ze opengesneden werd, goed te zijn, alleen waren enkele boekelscheuren aanwezig.

Zoals blijkt, hadden verschillende der proefkazen naast meer of minder groote scheuren aan den rand, ronde holten in het midden, iets wat in verband staat met de plasticiteit van het deeg¹⁾.

Reeds in onze vroegere publicatie over „knijpers” werd medegedeeld, dat dergelijke kazen in het algemeen een hoog gehalte aan z.g. paracaseïne-bilactaat bevatten, behalve in het midden-gedeelte, waar het voor het boterzuurferment, in verband met het zoutgehalte, mogelijk is de kaasstof aan te tasten en eene plastische omgeving te scheppen. Hierdoor ontstaat een eenigszins week, donker geelgekleurd middengedeelte, omgeven door een hardere massa. Het gas door het boterzuurferment gevormd, zal dus in de zachte kern der kaas meer of minder ronde holten doen ontstaan, daarentegen in het hardere randgedeelte scheuren. Om dus te verkrijgen dat niet alleen aan den rand scheuren optreden, doch door het gansche deeg heen, moest de plasticiteit verminderd worden. Dit is te bereiken, zooals in vroegere publicaties vermeld wordt, door toevoeging van melksuiker aan de te verkazen melk. Op deze wijze is nog een proef genomen, teneinde een geprononceerde knijperscheur te doen ontstaan.

6 November 1915. Gemaakt van 48 K.G. mengmelk der boerderij, 2 kazen gemerkt PRM en CM.

De melk voor PRM bevatte:

240 gram melksuiker,

7½ gram kalisalpeter,

1 cultuur van *lactis aerogenes*,

1 cultuur van *coli-commune*,

de helft van 2 doorengemengde culturen (± 8 c.c.) van het boterzuurferment,

25 c.c. reincultuur.

De melk voor CM bevatte:

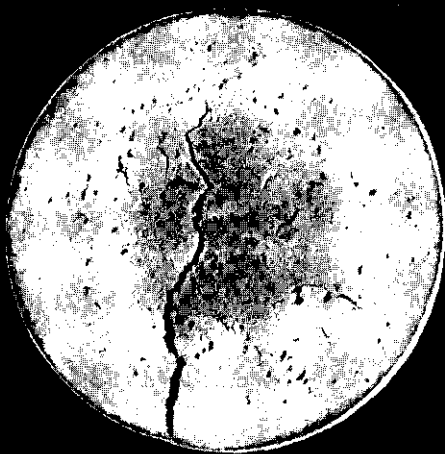
240 gram melksuiker,

de andere helft der gemengde culturen van het boterzuurferment, 25 c.c. reincultuur.

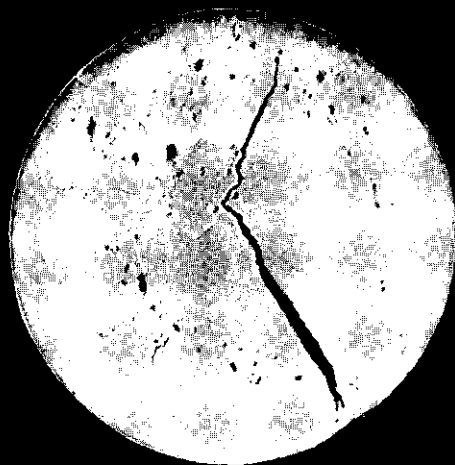
Op 16 November 1915 wordt CM doorgesneden. De kaas is een typische knijper geworden; in de korst is de gootvormige gleuf ontstaan. Terzelfder tijd is deze ook bij PRM gevormd; doch wordt deze proefkaas eerst opengesneden op 24 November 1915. *Ze blijkt dan een typische „knijper” te zijn met zeer geringe rijzing. Salpeter is niet meer aanwezig.*

Deze proeven toonen dus aan, dat wanneer naast boterzuurfermenten ook *coli-commune* en *lactis-aerogenes* voorkomen, een gun-

¹⁾ Zie hierover de mededeeling „Over korte kaas” en „Boekelscheuren” in deze Verslagen, No. IX 1911 en No. XI 1912.



1



2

stige invloed van salpeter uitgesloten is, omdat deze stof in dat geval reeds uit de kaas verdwenen is vóór ze den groei van het boterzuurferment kan beletten. De werking is dus als onze veronderstelling aangaf.

Figuurverklaring. De photo's zijn die van de kazen CM (1) en PRM (2) van $\frac{6}{11}$ 15. Op de plek, waar de scheur tegen de korst aanloopt, is de typische gootvormige indeuking te zien, welke dergelijke kazen dikwijls vertoonen.

Der Fehler „Knipers“ in Edamer Käse.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen.)

Die Versuche mit Kalisalpeter zur Bekämpfung des Käsefehlers „Knippers“ im Laboratorium schlagen immer; dagegen kann in der Praxis bisweilen kein Einfluss eines Salpeterzusatzes nachgewiesen werden. Wir erklärten diese Gegenseitigkeit folgenderweise: Bei den Versuchskäsen handelt es sich ausschliesslich um eine Infektion mit Buttersäure-bakterien. In der Praxis bilden die Buttersäure-bakterien selbstverständlich nur ein Unterteil der ganzen Infektion und die Zusammensetzung der Bakterienflora bei dieser Infektion ist eben entscheidend für eine richtige oder fehlerhafte Wirkung des Salpeters. Weil der Fehler erst nach etwa 10—14 Tagen auftritt, muss der Salpeter während jener Zeit intakt im Käse vorkommen, wenn er zum richtigen Zeitpunkt zugegen sein soll. Wird der Salpeter aber vorzeitig vernichtet, so bleibt selbstredend seine günstige Wirkung aus. Zu den Bakterien, welche Salpeter angreifen können, gehört bekanntlich das *Coli commune*, welches die Blähung im Käse hervorruft. Dieser Fehler wird gleichfalls mit Kaliumnitrat bekämpft, wie wir hier 1904 mitgeteilt haben. Jenes Salz wird durch die Bakterien vollständig zersetzt und zwar wird es anfänglich reduziert zu Nitrit, welche Verbindung durch weitere Einwirkung zerfällt.

Wird also in der Milch neben Buttersäurefermenten auch *Coli commune* im virulenten Zustande durch die Infektion gebracht, so wird der Salpeter nach kurzer Zeit nicht mehr im Käse vorhanden sein und seine günstige Wirkung auf die Buttersäurebakterien ist dann ausgeschlossen. In dieser Weise kann daher erklärt werden, weshalb das Mittel in der Praxis mitunter versagt. Durch die nachfolgenden Versuchen wurde die Richtigkeit obiger Erklärung festgestellt.

Die Reinkultur eines Buttersäureferments in Löfflerscher Gelatine mit $\frac{1}{2}$ Proz. Galactose-Zusatz erhielten wir in der früher beschriebenen Weise aus einem „Knipper“ der Praxis. Dieser Knipper diente gleichfalls zur Untersuchung der darin gebildeten flüchtigen Fettsäuren nach der Methode von Duclaux. Aus den Destillationszahlen ging hervor, dass die aus dem Käse abdestillierte Säure ein Gemisch von einem Teile Buttersäure und etwa

drei Teilen Essigsäure ist. Von diesen beiden Säuren wird die Essigsäure grösstenteils wenn nicht vollständig gebildet durch die im Knijper vorhandenen Milchsäurebakterien. Wenn man nl. die Gährungsproducte der Buttersäurebakterien in Reinkulturen nach dieser Methode untersucht, findet man freilich, dass neben Buttersäure wahrscheinlich eine oder mehrere andere flüchtige Säuren vorkommen, doch ist es uns nicht gelungen Essigsäure darin nachzuweisen. Als Bakterien, welche fähig sind den Kalisalpeter zu reduzieren, dienen das Coli-commune und das Bakterium lactis aerogenes, beide isolirt aus einem geblähten Käse, mittelst Molkengelatine.

Mit Rücksicht auf die kältere Jahreszeit in welcher der Versuch stattfand, wurden die Versuchskäse in einem künstlich erhitzten Raume zur Förderung des Bakterienwachstums aufbewahrt, weil „Knijpers“ nur in der warmen Jahreszeit auftreten. Es wurden jetzt einige Serien Versuchskäse hergestellt aus Mischmilch der Versuchsmolkerei, teils mit Salpeter, Buttersäurefermenten und Blähungsorganismen neben Milchsäurebakterien, teils bloß mit Buttersäurebakterien und Milchsäurefermenten. Beide Käsesorten wurden „Knijpers“; Controllkäse aus derselben Mischmilch zeigten, dass die Milch für sich keine Buttersäurebakterien oder Blähungsorganismen enthielt. Bei der Oeffnung war aus allen Versuchskäsen der Salpeter verschwunden.

Diese Versuche beweisen also, dass ein günstiger Einfluss von Salpeter ausgeschlossen ist, wenn neben dem Buttersäurefermente auch *B. coli-commune* und *B. lactis aerogenes* vorkommen, welche das Schutzmittel vernichten bevor es die Entwicklung der Buttersäurebakterien unterdrücken kann.
