

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

De normale gasvorming in kaas

DOOR

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

In deze Verslagen n^o. XI 1912 deelden we reeds mede, dat de z.g. boekelscheuren hun ontstaan te danken hebben aan eene gasontwikkeling, welke in de kaas plaats grijpt, in verband met de consistentie van het deeg. De factoren, welke de plasticiteit van de kaasmassa beïnvloeden, werden toen besproken, de oorzaak van de gasontwikkeling lag echter nog in het duister. Het was dus gewenscht een onderzoek in te stellen naar het micro-organisme, dat onder de voedingsvoorwaarden, zooals die in de kaas heerschen, in staat is gas te produceeren. Aangezien de boekelscheuren zich beginnen te ontwikkelen na ongeveer 12 dagen, een tijdstip dus waarop geen melksuiker meer in de kaas voorkomt, zoo heeft het ferment alleen tot zijne beschikking melkzure kalk voor koolstofbron en peptonen of caseïne voor stikstofbron. Als voedingsmedium werd daarom gekozen de vloeistof zooals v. Freundenreich en Jensen die gebruikten bij hun onderzoekingen naar de propionzuurgisting in de Emmenthaler kaas ¹⁾, welke bestaat uit:

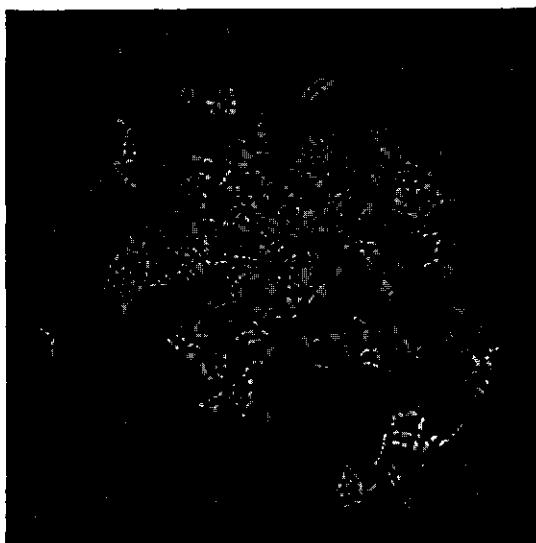
Water	1000 c.c.
Pepton Witte	10 gram.
Bikaliumphosphaat	2 „
Keukenzout	5 „
Melkzure kalk	20 „

eene vloeistof dus die in samenstelling vrijwel overeenkomt met het voedingsmedium, zooals dat in kaas voorligt. Het neerslag dat zich vormt door de wisselwerking tusschen het bikaliumphosphaat en de melkzure kalk en dat in hoofdzaak bestaat uit 34,5 pct. CaO, 27,3 pct. P₂O₅ en 37,3 pct. organische stof, waarvan 4,5 pct. stikstof ²⁾, werd niet afgefiltreerd.

Daar het cultiveeren, met het oog op de afwezigheid van zuurstof in de kaas, anaerob geschiedde, werd deze voedings-

¹⁾ Centralblatt für Bakteriologie IIe abt. Bnd. XVII 1907, blz. 529.

²⁾ Theoretisch zoude bicalciumphosphaat moeten praecipiteeren. De afwijkende samenstelling zal dus waarschijnlijk te verklaren zijn door adsorbeeren van pepton en melkzure kalk uit de oplossing.



is de grootte der koloniën, na 8 dagen bij 21° C. bebroed te zijn, die van een speldepunt; kolonies in deze gelatine zijn grooter, hetzij anaerob of in diepe laag gekweekt wordt.

Op weigelatine zijn de kolonies na 5 dagen zoo groot als een speldepunt; na 7 dagen iets grooter. Er ontstaan op dezen voedingsbodem involutievormen. In weigelatine zijn de kolonies bij anaerob-cultiveeren na 3 dagen bij 21° C. reeds veel grooter. Gasontwikkeling heeft daarin echter niet plaats, wel in de eerstgenoemde gelatine.

Melk is voor de bacterie geen gunstig voedingsmedium; na 3 tot 6 weken bij 21° C. treedt daarin zoo goed als geen ontwikkeling op. Op het gezicht verandert de vloeistof niet, terwijl op den bodem der buisjes zich een weinig bezinksel vormt, dat vrij groote knotsvormige involutievormen van het micro-organisme bevat. De reactie blijft zoo goed als amphoteer. In wei blijft groei meerendeels uit. Toch kan soms ontwikkeling optreden, zoo bij stam No. 4 welke lactose aantast. De groei in de vloeistof met melkzure kalk en daarmede samenguaende gasontwikkeling is in groote mate afhankelijk van het neerslag dat er in voorkomt. Verwijdert men het niet, dan verschijnen na een zevental dagen gasbellen, welke opstijgen uit het bezinksel, dat zich op den bodem der buisjes bevindt, terwijl de bovenstaande vloeistof helder blijft. Gebruikt men echter de pepton-calciumlactaatoplossing, nadat het praecipitaat eerst is afgefiltreerd, dan blijft de gisting uit, doch treedt deze normaal op als vervolgens bicalciumphosphaat wordt toegevoegd.

De rol van het praecipitaat bestaat dus daarin dat het, aangezien het door wisselwerking tusschen het calciumlactaat en het bikaliumphosphaat alle beschikbare phosphorzuur bevat, als phosphorzuurbron dienst doet.

Dat de bacterie groeit op de gelatine, waaruit het neerslag is afgefiltreerd, is wel te verklaren door de zure reactie der toegevoegde gelatine, waardoor bicalciumphosphaat in oplossing gaat, en omdat handelsgelatine calciumphosphaten bevat.

Wordt in de vloeistof het bikaliumphosphaat vervangen door monocalciumphosphaat¹⁾, zoodat de wisselwerking uitblijft, dan ontstaat, in tegenstelling met de vorige culturen, waarbij de vloeistof helder blijft, groei door het geheele voedingsmedium heen en wordt dit dus gelijkmatig troebel.

Wat de verdere voedingsstoffen betreft het volgende:

Voor stikstofbron is de bacterie aangewezen op pepton; noch asparagin, ammonium of kaliumnitraat kunnen dit vervangen. Wel echter treedt gisting op in buisjes met eene 2 pct. calciumlactaatoplossing, waarin 1 gram jonge Edammer kaas is gebracht.

1) Aangezien door verhitten in den autoclaaf op 120° C. in eene dusdanige oplossing een sterk neerslag ontstaat, is een Chamberland-filter te gebruiken.

De volgende analyse geeft de samenstelling van het gas, dat zich daarbij vormt, boven water opgevangen:

Totaal volume	45,8 c.c.	
na absorbtie in KOH	33,6 „	
CO ₂	—	12,2 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	33,6 c.c.	
O ₂	—	0,0 c.c.
genomen van de rest	33,2 c.c.	
na absorbtie met Palladium	0,6 „	
H ₂	—	32,6 c.c.
zoodat het bestond uit:	12,2 c.c. CO ₂	
	33,0 „ H ₂	
	0,6 „ N ₂	

Als koolstofbron is calciumlactaat in de eerste plaats te noemen. Andere lactaten, b.v. het natriumzout, leveren geen gisting, zoodat het melkzuur aan kalk gebonden aanwezig schijnt te moeten zijn om deze te verkrijgen.

De hoeveelheid melkzure kalk, welke in de vloeistof verdragen wordt, is vrij groot en kan tot 12 pct. toe gaan. De gisting treedt bij die concentratie tot 12 dagen na de enting op.

Het gas dat in de peptoncalciumlactaatoplossing ontwikkeld wordt, bestaat uit een mengsel van *koolzuur*, *waterstof* en *stikstof* in wisselende hoeveelheden. Hieronder volgt een analyse van het gasmengsel, boven water opgevangen:

Gasvolume	38,0 c.c.	
na absorbtie in KOH	28,6 „	
CO ₂	—	9,4 c.c.
na absorbtie in rookend H ₂ SO ₄	28,6 c.c.	
zware koolwaterstoffen	—	0,0 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	28,6 c.c.	
O ₂	—	0,0 c.c.
na absorbtie in Cu ₂ Cl ₂	28,6 c.c.	
CO	—	0,0 c.c.
genomen van het restant	8,2 c.c.	
aangevuld met lucht tot	45,0 „	
na explosie	33,9 „	
verdwenen	11,1 c.c.	
na absorbtie in KOH	33,9 „	
CO ₂	—	0,0 c.c.
dus H ₂	—	7,4 „
zoodat het gas bevatte:	9,4 c.c. CO ₂	
	25,9 „ H ₂	
	2,7 „ N ₂	

Twee andere analyses gaven respectievelijk :

6,4 c.c.	7,2 c.c. CO ₂
24,05 „	25,4 „ H ₂
1,8 „	1,8 „ N ₂

Met het oog op de oplosbaarheid van het koolzuur in water geven deze cijfers zooals vanzelf spreekt slechts de kwalitatieve samenstelling weer. Deze komt echter overeen met de samenstelling van het gas in kazen met boekelscheuren en ronde holten, zooals blijkt uit onze vroegere publicaties over dit onderwerp.

Naast het gas vormt de bacterie in de pepton-calciumlactaat-oplossing ook zuur, dat echter in gebonden toestand voorkomt, daar de reactie der vloeistof door den bacteriegroei zoo goed als niet verandert, zelfs van amphoter zeer weinig alcalisch wordt. Onderzocht volgens de methode Duclaux blijkt dit zuur *azijnzuur* te zijn, waarvan de gevormde hoeveelheid per 300 c.c. cultuur na 14 dagen bedraagt ± 9 c.c. $\frac{1}{10}$ normaal of ongeveer 0,054 gram; deze hoeveelheid neemt toe naarmate de cultuur ouder wordt.

De levensduur van het ferment in de pepton-calciumlactaat-oplossing is zeer groot. Culturen van de stammen 1, 2 en 3, welke gemaakt waren in Januari, Februari, Maart, April en Juni, bleken in November allen nog levend en in staat gas te produceeren, behalve één cultuur van Januari No. 1. In het algemeen gesproken kan men dus zeggen, dat na tien maanden dergelijke culturen nog actieve bacteriën bevatten.

Behalve melkzure kalk kunnen ook nog suikers als koolstofbron gebruikt worden. De enkelvoudige koolhydraten als galactose, dextrose en laevulose worden door alle stammen aangetast onder zuurvorming, terwijl somtijds daarnaast gasontwikkeling plaats grijpt. De disachariden, lactose en maltose daarentegen worden door sommige stammen niet, door andere wel verbruikt, doch dan immer onder gasontwikkeling en zuurvorming. Zoo tast stam No. 4 de lactose aan en de stammen No. 4 en No. 5 de maltose. Rietsuiker wordt echter door geen der vijf stammen opgenomen.

De gisting treedt in vloeistoffen met koolhydraten soms nog tot 1 maand na de enting op, doch duurt over het algemeen niet lang.

Een kolfje met 50 c.c. van een vloeistof, waarin:

2 pct. pepton,

$\frac{1}{2}$ pct. NaCl,

0,2 pct. bicalciumphosphaat,

5 druppels eener geconcentreerde CaCl₂-oplossing,

$\frac{1}{2}$ pct. galactose,

en geënt met stam No. 1, luchtledig gepompt en toegesmolten, bevatte 17 dagen daarna een gasmengsel bestaande uit *waterstof*, *koolzuur* en *stikstof*, dezelfde gassen dus als in de pepton-calciumlactaatoplossing geproduceerd worden. De zuurvorming

week echter van die in laatst genoemde vloeistof af in zooverre, dat behalve azijnzuur ook nog niet vluchtig zuur gevormd werd.

Werd de galactose vervangen door dextrose en geënt met stam No. 3, waarbij gisting uitbleef, dan kwam na 17 dagen in de vloeistof het azijnzuur niet voor, doch alleen niet vluchtig zuur. Er schijnt dus verband te bestaan tusschen de gisting en het ontstaan van azijnzuur. Wellicht valt het molecuul galactose of melkzure kalk, wanneer door het ferment daaraan zuurstof onttrokken wordt, uiteen onder vorming van CO_2 , H_2 en $\text{CH}_3 \text{CO OH}$. De hoeveelheid zuur, welke in de vloeistoffen met de enkelvoudige suikers gevormd wordt, varieert van 25 tot 43 c.c. $\frac{1}{10}$ norm. per 100 c.c., waarvan het azijnzuur, dat in sommige gevallen ontstaat, ongeveer $\frac{1}{8}$ bedraagt. In het niet vluchtig gedeelte komen zuren voor, welke oplosbaar zijn in aether en optisch actieve zinkzouten leveren; doch melkzuur is daarin niet aanwezig.

De invloed, welke de zuurstof op de gisting uitoefent, wordt geïllustreerd door de volgende proef:

Op 11/8 1915 werden van verschillende bacteriënstammen, afkomstig uit de diverse kazen, anaerobe en aerobe culturen aangelegd in de pepton-melkzurekalkoplossing. De toegesmolten leeggepompte buisjes vertoonen na eenige dagen reeds gisting, terwijl bij de culturen in open reageerbuisen van één bacteriënstam het verschijnsel optreedt na 6 dagen en culturen van twee andere bacteriënstammen zelfs na 10 dagen nog geen gasbellen te zien geven. Hoewel dus de zuurstof de gisting niet bepaald belemmert, zoo blijkt wel dat ze, vooral bij de minder sterk vergistende stammen, in ongunstigen zin inwerkt. Wat de groei betreft in verband met de temperatuur is op te merken, dat 21°C . voor de bacterie een gunstige warmtegraad kan genoemd worden. Hoogere temperaturen bevorderen den groei, lagere daarentegen verlangzamen de ontwikkeling beduidend; zoo trad in anaerobe culturen, die bewaard waren bij een keldertemperatuur, welke schommelde tusschen $10\frac{1}{2}$ tot $12\frac{3}{4}^\circ \text{C}$., eerst groei op na 18 dagen.

De doodingstemperatuur van het micro-organisme werd bepaald door buisjes gevuld met de pepton-calciumlactaatoplossing na enten luchtledig te pompen en toe te smelten en gedurende 10 minuten geheel onder te dompelen in water van verschillende temperatuur, waarna ze in een thermosphaat van 21°C . geplaatst werden.

In de culturen verhit op 50°C . ontstond nog groei daarbij na 9 dagen; werd de verhitting echter opgevoerd tot 55°C ., dan bleef zelfs na 20 dagen elke gisting uit. Onder deze omstandigheden bleek de doodingstemperatuur dus te liggen tusschen 50 en 55°C ., zoodat de bacterie bij betrekkelijk lagen warmtegraad afsterft.

Met het oog op het gedrag van het micro-organisme in de kaas werd nagegaan hoe het zich hield in de melkzurekalkpeptonoplossing, waaraan verschillende hoeveelheden zout en melkzuur waren toegevoegd.

Op 12 April 1915 werd een reeks buisjes, bevattende ieder 10 c.c. der oplossing en afwisselende hoeveelheden zout en verdund melkzuur, geënt met verschillende stammen van het ferment afzonderlijk.

Na verwijderen der zuurstof en tosmelten werden de buizen bij 21° C. geplaatst. Nagegaan werd nu of al dan niet bacteriënontwikkeling plaats greep. Onderstaande tabelletjes geven de resultaten van het onderzoek weer; het teeken + daarin geeft aan dat gisting optrad op den aangegeven datum, het teeken — dat deze uit was gebleven.

Invloed van zout.

Buisjes met bacterie stam No. 1.

Toegevoegde hoeveelheid Na Cl.	Datum der waarneming.
2 pct.	17 April 1915 +
3 „	19 „ 1915 +
4 „	22 „ 1915 + zwak.
5 „	30 „ 1915 —

Buisjes met bacterie stam No. 3.

2 pct.	19 April 1915 +
3 „	19 „ 1915 +
4 „	28 „ 1915 +
5 „	30 „ 1915 —

Rekent men bij deze hoeveelheden zout nog het ½ pct., dat de vloeistof reeds bevat, dan blijkt, dat de uiterste zoutconcentratie, welke voor de gisting nog toelaatbaar is, ongeveer 4½ pct. bedraagt.

Invloed van melkzuur.

Buisjes met bacterie stam No. 1.

Toegevoegde hoeveelheid melkzuur.	Datum der waarneming.
0,1 pct.	17 April 1915 +
0,3 „	22 „ 1915 +
0,5 „	30 „ 1915 —
0,7 „	30 „ 1915 —

Buisjes met bacterie stam No. 3.

0,1 pct.	17 April 1915 +
0,3 „	27 „ 1915 +
0,5 „	30 „ 1915 —
0,7 „	30 „ 1915 —

Invloed van zout en melkzuur.

Buisjes met bacterie stam No. 1.

De vloeistof bevat 0,1 pct. melkzuur.

Toegevoegde hoeveelheid Na Cl.	Datum van waarneming.
3 pct.	19 April 1915 +
5 "	30 " 1915 —
7 "	30 " 1915 —

De vloeistof bevat 0,2 pct. melkzuur.

3 pct.	27 April 1915 +
5 "	30 " 1915 —
7 "	30 " 1915 —

Buisjes met bacterie stam No. 3.

De vloeistof bevat 0,1 pct. melkzuur.

Toegevoegde hoeveelheid Na Cl.	Datum van waarneming.
3 pct.	19 April 1915 +
5 "	30 " 1915 —
7 "	30 " 1915 —

De vloeistof bevat 0,2 pct. melkzuur.

3 pct.	27 April 1915 +
5 "	30 " 1915 —
7 "	30 " 1915 —

Uit deze tabelletjes is dus te zien, dat, met het $\frac{1}{2}$ pct. Na Cl reeds in de vloeistof aanwezig, de zoutconcentratie in zure omgeving minstens $3\frac{1}{2}$ pct. mocht bedragen. Verdere proeven in deze richting genomen toonden aan, dat bij toevoeging van 0,1 pct. melkzuur, na 21 dagen ook nog gisting ontstond, wanneer $4\frac{1}{2}$ pct. Na Cl aanwezig was en na één maand bij $5\frac{1}{2}$ pct. keukenzout. In gelatine bereid met de pepton-calciumlactaatoplossing, is het weerstandsvermogen der bacterie tegen zout veel geringer.

Op 10 Januari 1916 werden buizen met dien voedingsbodem en $3\frac{1}{2}$ en $4\frac{1}{2}$ pct. Na Cl geënt met drie verschillende stammen afzonderlijk.

Den 24sten Februari daaraanvolgende was in geen dezer anaerobe culturen groei opgetreden.

Een zoutconcentratie, die dus in de vloeistof verdragen wordt, belet in de gelatine elke ontwikkeling.

Daar uit de analyse van het gas bleek, dat waterstof in niet onbelangrijke hoeveelheid daarin voorkwam, werd nagegaan of de bacterie ook reduceerende eigenschappen bezat tegenover zouten, welke gemakkelijk hun zuurstof afgeven, zooals kaliumnitraat, natriumnitriet en kaliumchloraat.

Op 15/5 1915 werden buisjes met de pepton-calciumlactaat-oplossing, waarin 0,03 pct. en 0,05 pct. KNO_3 , na enting luchtledig gepompt, toegesmolten en bij 21°C . geplaatst. 4 dagen later is in alle culturen gisting opgetreden. Nitrieten zijn aan te toonen, doch blijft na behandeling der vloeistof met ureum en zwavelzuur de diphenylaminreactie uit, zoodat nitraten afwezig zijn. Zelfs nog 10 dagen na de enting blijft deze toestand voortbestaan.

Reductie van het kaliumnitraat tot nitriet heeft dus reeds vrij spoedig plaats, doch een verder omzetten der nitrieten schijnt in dit geval langzamer te geschieden. In de overeenkomstige gelatine gebeurt hetzelfde, alleen verloopt de reductie dan in een minder snel tempo.

Zijn echter alleen nitrieten in de vloeistof aanwezig, dan heeft daarvan totale reductie plaats, zoodat ze geheel en al verdwijnen. De verhouding van het ferment ten opzichte van natriumnitriet wordt geïllustreerd door het volgende:

20/4—24/4 1915 worden buisjes met de pepton-calciumlactaat-oplossing, waarin 0,03 pct. en 0,05 pct. NaN_2 , geënt met de stammen 1, 2 en 3 afzonderlijk; daarna luchtledig gemaakt, toegesmolten en bij 21°C . geplaatst.

Op 1/5 treedt gisting op in het buisje, waarin 0,03 pct. NaN_2 met stam No. 3 en drie dagen later in dat met 0,05 pct. van denzelfden stam. Op 7/5 is in beide buisjes geen nitriet meer aanwezig. Den 8sten Mei ontstaat gisting in de cultuur met 0,03 pct. nitriet van No. 1 en den 10den in die van No. 2. Het onderzoek van 10 Mei toont aan, dat in geen der buisjes nitriet meer voorkomt. Op 14/5 gisten de culturen met 0,05 pct. van de stammen 1 en 2, terwijl den volgenden dag in beide nog nitriet in meer of minder sterke sporen aanwezig is.

Het blijkt dus, dat bij aanwezigheid van KNO_3 of NaN_2 de gisting niet eerst dan optreedt, wanneer deze zouten totaal gereduceerd zijn. Vooral bij de nitrieten, hoewel deze in kleine hoeveelheden totaal gereduceerd worden, schijnt voor het ferment de zuurstof niet lossen gebonden te zijn dan bij het calciumlactaat, zoodat naast het nitriet ook het melkzuurzout wordt aangetast en dus gisting ontstaat. Deze toch zal, in verband met de reductieverschijnselen, verklaard moeten worden als het onttrekken van zuurstof aan het calciumlactaat, waardoor het uiteenvalt onder vorming van CO_2 en H_2 .

Het gedrag van het ferment ten opzichte van kaliumchloraat komt overeen met dat tegenover de voorgaande zuurstofhoudende zouten. Ook wanneer deze verbinding aan de pepton-calciumlactaatoplossing wordt toegevoegd ontstaat na eenigen tijd gisting.

De invloed, welken de genoemde zouten in de kaas uitoefenen op het gebrek, gelijkt op dat wat we zien gebeuren in de culturen.

Op 20/5 1915 gemaakt van ± 50 Liter gepasteuriseerde melk der Proefzuivelboerderij 2 kazen, gemerkt C XVIII en BS 18 S.

C XVIII bevat:

30 c.c. van een reïncultuur in melk van een melkzuurferment;
3 c.c. van een reïncultuur van den stam No. 1 in de pepton-calciumlactaatoplossing.

BS 18 S bevat:

30 c.c. van dezelfde reïncultuur van het melkzuurferment;
3 c.c. van dezelfde reïncultuur van No. 1;
12½ gram KNO_3 .

De kazen worden doorgesneden op 29/5.

C XVIII is dan een flinke knijper met veel bockelscheuren.
BS 18 S is geheel gesloten; nitraten zijn nog aanwezig, nitrieten ontbreken.

21/5 1915. Gemaakt van 50 Liter gepasteuriseerde melk der boerderij 2 kazen, gemerkt C 19 en BS 19 S.

C 19 bevat:

30 c.c. reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
2 c.c. reïncultuur van stam No. 2 in de pepton-calciumlactaatoplossing.

BS 19 S bevat:

30 c.c. reïncultuur van het melkzuurferment in melk;
2 c.c. van dezelfde reïncultuur van No. 2;
12½ gram KNO_3 .

Op 11/6 1915 wordt C 19 opengesneden en blijkt knijperig te zijn, 3 dagen daarna geschiedt hetzelfde met BS 19 S. Deze is eveneens knijperig; nitraten of nitrieten zijn niet aan te toonen.

25/5 1915. Gemaakt van 50 Liter gepasteuriseerde melk der boerderij 2 kazen, gemerkt C 20 en SBS XX.

C 20 bevat:

30 c.c. reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
1 c.c. reïncultuur van stam No. 3 in de pepton-calciumlactaatoplossing.

SBS XX bevat:

30 c.c. reïncultuur van het melkzuurferment in melk;
1 c.c. van dezelfde reïncultuur van stam No. 3;
12½ gram KNO_3 .

Op 11/6 wordt C 20 doorgesneden, het is een flinke knijper geworden, SBS XX, opengesneden op 24/6, blijkt geheel gesloten te zijn; nitraten zijn nog aanwezig, doch nitrieten ontbreken.

Deze proeven leveren verschillende gegevens. Eerstens blijkt er uit, dat zoolang nitraat nog aanwezig is, de gasvorming uitblijft, zoo in de kazen van 20 en 25 Mei. Is het echter gereduceerd en de zuurstof totaal verbruikt, dan treedt gisting op, waarvan de kaas van 21 Mei een voorbeeld geeft. Een overeenkomstig verschijnsel dus als in de culturen plaats grijpt.

Behalve dit inzicht in de reductieverschijnselen geven de kazen ook eenige aanwijzing omtrent een feit, dat men in de praktijk heeft geconstateerd. Daar heerscht namelijk de meening, dat wanneer boekelscheuren in erge mate aanwezig zijn, het gebrek dan aanleiding kan geven tot het ontstaan van knijpers. Wanneer dus veel gas ontwikkeld is of met andere woorden, een bijzonder sterke infectie der melk met het ferment heeft plaats gehad, zouden „knijpers” ontstaan. Zooals blijkt uit bovenstaande proeven, berust deze meening op goede gronden. De daarbij gebruikte hoeveelheden cultuur van het ferment zijn veel te groot geweest om alleen boekelscheuren te voorschijn te roepen en hebben zich daardoor de kazen tot „knijpers” ontwikkeld. Alleen dient hierbij in aanmerking te worden genomen, dat het pasteuriseren der melk gedurende 10 minuten op 70—72° C. de kaas brosser maakt, zoodat het ontstaan van „knijpers” daardoor in de hand wordt gewerkt. Wat den invloed van kaliumchloraat betreft, deze is dezelfde als van het nitraat. Voegt men aan de kaasmelk in plaats van het laatste $KClO_3$ toe, dan treden dezelfde verschijnselen op.

26/5 1915. Gemaakt van 50 Liter gepasteuriseerde melk der boerderij 2 kazen, gemerkt C 1 en K B S 1.

C 1 bevat:

30 c.c. reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
2 c.c. reïncultuur van den stam No. 1 in de pepton-calciumlactaatoplossing.

K B S 1 bevat:

30 c.c. van de reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
2 c.c. van dezelfde reïncultuur van No. 1;
7½ gram kaliumchloraat.
Op 11/6 wordt C 1 opengesneden en blijkt deze een flinke „knijper” te zijn. K B S 1, welke 5 dagen later wordt doorgesneden, is knijperig onder de korst; in het midden bevindt zich een zeer groote boekelscheur van ± 6 c.M. lengte.

27/5 1915. Gemaakt van 50 Liter gepasteuriseerde melk der boerderij 2 kazen, gemerkt C II en B S K 2.

C II bevat:

30 c.c. reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
1 c.c. reïncultuur van stam No. 2 in de pepton-calciumlactaatoplossing.

B S K 2 bevat:

30 c.c. reïncultuur in melk van het melkzuurferment;
1 c.c. van dezelfde reïncultuur van No. 2;
7½ gram kaliumchloraat.
Den 16den Juni wordt C II opengesneden, de kaas is knijperig onder de korst, middenin bevinden zich boekelscheuren. B S K 2, welke 3 Juli wordt opengesneden, bevat wat onregelmatige gaatjes.

Ook bij deze kazen heeft dus, ondanks de toevoeging van kaliumchloraat, gasontwikkeling plaats gegrepen. In het algemeen kan daarom gezegd worden, dat zoodra het ferment geen los gebonden zuurstof meer tot zijne beschikking heeft, het deze onttrekt aan de melkzure kalk, (door de melkzuurgisting in de kaas gevormd), waardoor waterstof en koolzuur vrij komen, welke gassen al naar de mate van hunne hoeveelheid en de plasticiteit van het kaasdeeg aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van boekelscheuren, ronde of onregelmatige holten of „knijpers”.

Dat de samenstelling van het gas, zooals dit door het ferment in de kaas ontwikkeld wordt, overeenkomt met die van het gas in kazen uit de praktijk, blijkt uit de analyse. Als voorbeeld volgt hieronder een onderzoek van het gas, afkomstig uit een tweetal der verscheidene proefkazen, welke met het ferment gemaakt werden.

1°. Gas uit een proefkaas uit gepasteuriseerde melk, welke een kleine knijperscheur bevatte, naast vele groote boekelscheuren en ronde holten. Het werd boven water opgevangen:

totaal volume gas	27,8 c.c.	
na absorbtie in KOH	24,2 „	
CO ₂	—	3,6 c.c.
na absorbtie in pyrogallol	24,0 c.c.	
O ₂	—	0,2 c.c.
genomen van de rest	12,2 c.c.	
aangevuld met lucht	65,0 „	
na explosie.	50,6 „	
verdwenen	14,4 c.c.	
na absorbtie in KOH	50,6 „	
CO ₂	—	0,0 c.c.
methaan dus afwezig:		
H ₂		9,6 c.c.

Rekening er mede houdende, dat de zuurstof uit toevallig bijgekomen lucht afkomstig is (in kaas komt zuurstof niet voor), zoodat het totaal volume met 1 c.c. verminderd wordt, zoo bestaat het gas uit:

3,6 c.c.	CO ₂
18,9 „	H ₂
4,3 „	N ₂

De analyse van het gas uit de tweede kaas, welke eveneens een kleine knijper was met veel groote boekelscheuren en ronde holten, leverde:

1,7 c.c.	CO ₂
10,4 „	H ₂
4,6 „	N ₂

Beide gasmengsels komen, zooals te zien is, overeen met dat van kazen uit de praktijk en ook met dat uit de culturen in de pepton-calciumlactaatoplossing, alleen wat de laatste betreft, met dit verschil, dat naar verhouding meer stikstof en minder koolzuur aanwezig is.

Dat boterzuurfermenten bij de vorming der ronde gaten en bockelscheuren geen rol speelden bleek daaruit, dat het ons, volgens de methode, toegepast bij ons onderzoek naar de oorzaak van het ontstaan van „knijpers”, niet gelukte die bacteriën uit de kazen te isoleren.

Figuurverklaring. De photo stelt de bacterie voor bij 1000 × vergrooting.

Die normale Gasbildung in Edamer Käse.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

In diesen Mitteilungen No. XI 1912 teilten wir schon mit, dass die s.g. „Boekel”risze entstehen durch die Gasbildung im Käse in Beziehung mit der Beschaffenheit des Käsesteiges. Die Bedingungen, welche die Plastizität der Käse-massa beherrschen, wurden damals ausführlich besprochen, jetzt galt es die Untersuchung nach der Gasbildung.

Durch die Bildung der „Bockelscheuren”, etwa 12 Tage nach der Herstellung der Käsen, muss die Gasentwicklung hervorgerufen werden von Bacteriën, welche keinen Milchzucker bedürfen, sondern Milchsäures-kalzium als Kohlenstoff-quelle verwenden können. Wir benutzten deshalb das Nährmedium für Propionsäure-bacterien von v. Freudenreich und Jensen, welches viel Ähnlichkeit besitzt mit den Bacterien-nährstoffen im Käse. Es wurde mit dieser flüssigen Nährsubstrat anaerob gezüchtet in evacuirten, zugeschmolzenen Glasröhrchen. Für Impfmateriale dienten Bohrungen aus Käsen mit schönen, runden Löchern oder „Bockelriszen”, welche mit physiologischer Salzlösungen angerieben wurden zu einer dicken Breie und kam etwa $\frac{1}{2}$ gr. derselben zur Impfung. Nach einer Woche bei 21° C. tritt in einzelnen Röhrchen Gährung auf, welche nach etwa zwei Tagen aufhört. Alsdann werden Ueberimpfungen in frischen Röhrchen angelegt mit etwa 3 mgr. Impfflüssigkeit. Die ausgegohrenen Kulturen dieser Ueberimpfung dienen zur Herstellung von Strichkulturen auf derselben Nährboden mit 10 pct. Gelatine; zur Impfung der Platte verwendet man gleichfalls ein groszes Platinöse von \pm 3 mgr. Inhalt. Nach einigen Tagen sucht man die gewünschten Bacterien unter den kleinsten Kolonien. Diese rufen in dem flüssigen Nährboden anaerob cultivirt nach 10—12 Tagen Gasentwicklung hervor. Die Dimensionen dieser Gasbildenden Bacterien sind: Länge etwa $1\frac{3}{4}$ —3 μ ; Breite 1,2 μ . Aerob entstehen auf Pepton-kalziumlactat-gelatine und Molkongelatine nur winzig kleine Kolonien. Anaerob in dieser Gelatine gezüchtet,

werden die Kolonien bedeutend grösser; nur in der ersten bildet sich Gas. Milch ist ein ungünstiger Nährboden; am Boden setzen sich Involutionen ab, ohne dass die Milch augenscheinlich sich ändert. Der Wachstum und die Gasentwicklung sind im hohen Grade abhängig von dem Niederschlage in der Pepton-Kalzium-lactat-lösung, weil dieser alle Phosphorsäure als Kalziumsalz enthält. Asparagin, Ammonium und Kaliumnitrat sind ungeeigneten Stickstoff-Quellen.

Das Gas stellte sich zusammen aus einer Gemenge von Kohlensäure, Wasserstoff und Stickstoff. Uebrigens bildet die Bacterie Essigsäure in der Pepton-Kalzium-lactat-lösung. Monosachariden werden zersetzt unter Säurebildung, während dann und wann Gasentwicklung auftritt, wobei dann u.a. Essigsäure entsteht. Disachariden ausser Saccharose werden von einzelnen Stämmen und dann unter Gasentwicklung angegriffen; die Zusammensetzung der Gährungsgase ist wiederum dieselben wie bei Verwendung der Pepton-lactat-lösung. Ausserhalb der Essigsäure wird in dem Nährmedium mit Monosachariden nicht flüchtige Säure gebildet, löslich in Aether, optisch active Zinksalze lieferend, aber keine Milchsäure darstellend.

Gasbildung und Essigsäure-production gehen hier im hohen Grade parallel. Unter aeroben Verhältnissen geht die Gasproduction sehr langsam und nur bei einigen Stämmen vor sich.

Die Anaeroben Bacterien-kulturen in Pepton-Kalzium-lactat-lösung sind sehr lebenskräftig und enthalten nach 10 Monaten noch lebende Bacterien.

Die Optimumtemperatur liegt etwa bei 21° C.; niedrige Temperaturen z. B. 10—12° C. verzögern den Wachstum stark; 10 Minuten erhitzen in Wasser von 55° C. tötet die Kulturen; 50° C. giebt schon eine sehr bedeutende Abschwächung. Die Empfindlichkeit für hohe Temperaturen ist bei dieser Bacterie also stark. Mit Rücksicht auf dem Benehmen im Käse wurde weiter der Einfluss von Kochsalz und Milchsäure in der Nährflüssigkeit studirt. Es wurden Röhren mit Pepton-Kalzium-lactat hergestellt mit verschiedenen Konzentrationen Milchsäure und Kochsalz, welche mit der Bacterie geimpft, aufgeköcht im Vacuum und zugschmolzen wurden. Bei 21° C. hingestellt trat bei 4½ pct. NaCl noch eben Gasbildung ein; Milchsäure wurde in einer Konzentration von 0.3 pct. vertragen. Ebenso trat Gährung in der Flüssigkeit ein mit 0.1 pct. Milchsäure und 4½ pct. NaCl nach 21 Tagen und bei 5½ pct. NaCl nach einer Monat. Gelatine-zusatz erhöht die Empfindlichkeit für Kochsalz.

Die Wasserstoff-bildung weist hin auf reducirende Eigenschaften. Nährmedien mit 0.03—0.05 pct. KNO_3 zeigen Reduction bis zur Umänderung aller Nitrat in Nitriet, aber weitere Reduction findet langsam statt; Nährflüssigkeit mit gleichen Mengen NaNO_2 zeigt kräftige Nitriet-reduction, sodass 0.03 pct. NaN_2 total verschwindet. Während der Nitriet-Reduction tritt Gasbildung auf.

Auch Kaliumchlorat wird reducirt, aber unterdrückt ebensowenig die Gährung.

Der Einfluss, welchen genannte Salze im Käse ausüben auf die Entwicklung der Bacterie, zeigt grosse Aehnlichkeit mit dem Verhalten in den Kulturen. Es wurden einige Edamer Käsen hergestellt aus pasteurisirter Milch, geimpft mit dem Gasbildner und 0,05 pct. KNO_3 , nebst Kontroll-käse ohne Nitrat. In einigen derselben fehlte jede Gährung nach 10—20 Tagen und war Nitrat noch vorhanden; wo Gasbildung in den Versuchskäsen auftrat war das Nitrat verschwunden; alle Kontroll-käse ohne Nitrat zeigten Gährung. Ausserdem wiesen diese Versuche nach, dass extreme Impfung mit diesen Gasbildnern Veranlassung giebt zur Entstehung van „Knypers“. Dieselbe Erscheinungen traten auf bei einer Serie Versuchskäsen hergestellt aus pasteurisirter Milch geimpft mit den Gasbildner und mit oder ohne Kaliumchloratzusatz.

Sobald also die Bacterie der Verfügung über den locker gebundenen Sauerstoff der Oxydationsmittel entbehrt, geht die Gasbildung aus Milchsäuren Kalzium vor sich, indem sie dieser Substanz den Sauerstoff zu entziehen versucht unter Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff, welche Gase jenach der Quantität und der Plasticität des Käseteiges Veranlassung geben zu „Boekelrisze“, kleinen oder grösseren runden Oefnungen oder groszen unregelmässigen Löchern und „Knypers“. Die Zusammensetzung des Gases in den Käsen ist genau dieselbe wie in den Reinkulturen und wie in den Käsen aus der Praxis mit „Boekelriszen“ und regelmässigen Löchern.

Dass die Buttersäure-bacterien nicht die Ursache der regelmässigen Gasbildung und der Boekelriszen sind, geht daraus hervor, dass es nie gelang aus derartigen Käsen nach der Methode zur Untersuchung der „Knypers“, die Buttersäure-fermente zu isoliren.