DE HYDROLYSE VAN VET BIJ DE KAASRIJPING IN VERBAND MET DE SMAAK VAN KAAS

J. J. STADHOUDERS

NN08201.212

DE HYDROLYSE VAN VET BIJ DE KAASRIJPING IN VERBAND MET DE SMAAK VAN KAAS

THE HYDROLYSIS OF CHEESE FAT IN RELATION TO THE FLAVOUR OF CHEESE

DE HYDROLYSE VAN VET BIJ DE KAASRIJPING IN VERBAND MET DE SMAAK VAN KAAS

THE HYDROLYSIS OF CHEESE FAT IN RELATION TO THE FLAVOUR OF CHEESE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD
VAN DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS IR. W. DE JONG,
HOOGLERAAR IN DE VEETEELTWETENSCHAP,
TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN EEN COMMISSIE UIT DE SENAAT
DER LANDBOUWHOGESCHOOL TE WAGENINGEN
OP VRIJDAG 12 OCTOBER 1956 TE 16 UUR

DOOR

J. J. STADHOUDERS

H. VEENMAN & ZONEN – WAGENINGEN – 1956

INHOUD

blz.

HOOFDSTUK I. Inleiding 3

HOOFDSTUK II. Enige waarnemingen betreffende de ontleding van het vet tijdens de kaasrijping 3

1. Het aantonen van vetsplitsing in kaas 3
2. De smaak van kaas en het zuurgetal van het vet 4
3. De invloed van het pasteuriseren van de te verkazen melk 4
4. De invloed van het gewicht en de vorm van de kaas 4
5. De invloed van de pH 6
6. De invloed van de consistentie 6
7. De invloed van de temperatuur waarbij de kaas rijpt 7
8. Het voortschrijden van de vetsplitsing 8

HOOFDSTUK III. Enzymen die in kaas ontleding van vet kunnen veroorzaken 8

1. De invloed van het stremsel 8
   a. Stremsel bevat geen lipase 8
   b. Stremsel oefent geen indirecte invloed uit op lipasen die in melk aanwezig zijn 9
2. De enzymen die van origine in de melk aanwezig zijn 9
   a. Enige proeven met „aseptisch" gewonnen melk 9
   b. Melklipase vertoont activiteit bij de pH van kaas 10
   c. De invloed van keukenzout op de activiteit van melklipase 12
   d. Enige proeven waarbij getracht werd melklipase op te hopen 13
   e. Vernietiging van lipase door pasteurisatie van de melk en vetontleding van de kaas 15
3. Lipasen van microbiologische oorsprong hebben invloed op de vetsplitsing in kaas 17
   a. De micro-organismen die voor de vethydrolyse belangrijk zijn, groeien niet in kaas 17
   b. In een gerijpte kaas bevinden zich geen levende micro-organismen die in belangrijke mate vet in kaas ontleden 17
   c. In kaas bereid uit een mengsel van rauwe en gepasteuriseerde melk treedt minder vethydrolyse op dan in kaas bereid uit alleen rauwe melk 19
   d. De vethydrolyserende bacteriën van rauwe melk 20
   e. Het rijpen van kaasmelk 21
   f. Tengevolge van een toevoeging van aërobe vethydrolyserende micro-organismen kan de vethydrolyse in kaas toenemen 23
4. De invloed van de korstflora 24
   a. De afbraak van vet geschiedt in de rand van de kaas sneller dan in het inwendige 24
   b. Een verklaring van de snelle vethydrolyse in het randgedeelte van kaas 24

HOOFDSTUK IV. De microbiologie van de vetsplitsing bij de kaasrijping 26

1. Inleiding 26
   a. De microflora van „aseptisch" gewonnen melk 27
   b. De in rauwe melk voorkomende micro-organismen 27
   c. De microflora van gepasteuriseerde melk 28
   d. De microflora van het inwendige van de kaas 29
   e. De microflora van het oppervlak van kaas 30
2. Methoden 32

3. Uitkomsten 32
a. De invloed der micrococcen 32
b. De invloed der melkzuurbacteriën op de vetsplitsing 37
c. De invloed van vertegenwoordigers van het geslacht *Bacterium* en *Corynebacterium* 38
d. De invloed van de gisten 40
e. De invloed van de schimmels 41
f. Over de invloed der gramnegatieve staafvormige bacteriën 42
α. De coli-aërogenesbacteriën (*Eshericheae*) 42
β. Vertegenwoordigers der *Serrateae*, der *Pseudomonas*soorten en der *Achromobacteriaceae* 42
g. De invloed van de aërobe sporevormers 44
4. Overzicht 45

HOOFDSTUK V. Steriele preparaten van vetsplitsende enzymen van bacteriële oorsprong 45
1. Het bereiden van actieve enzympreparaten 45
2. De invloed van de pH op de activiteit van bacteriële lipasen 46
3. Enzympreparaten en de vetsplitsing in kaas 46

HOOFDSTUK VI. Kwantitatieve bepaling van de in kaas, uit vet gevormde vrije vetzuren 48
1. Inleiding 48
2. Werkwijze voor het bepalen van de vrije vetzuren 50
a. Analysemethoden 50
α. de bepaling van de verzadigde vetzuren 50
β. de bepaling van de twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren 51
γ. de bepaling van de overige onverzadigde vetzuren 51
b. Het afscheiden van de vrije vetzuren uit kaasvet 51
α. het bepalen van de hoeveelheid vrije vetzuren 51
β. het afscheiden van de vetzuren ter bepaling van de lagere verzadigde vetzuren 51
γ. het afscheiden van de vetzuren voor de bepaling van de hogere verzadigde vetzuren 51
δ. het afscheiden van de vetzuren voor de bepaling van de twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren 52
ε. de bepaling van de hoeveelheid onverzadigde vetzuren 52
3. Uitkomsten 52
4. Conclusies 54

HOOFDSTUK VII. Verklaring van enige waarnemingen omtrent de vetsplitsing tijdens de kaasrijping genoemd in hoofdstuk II 54
1. Het pasteuriseren van de kaasmelk 56
2. De invloed van het gewicht en de vorm van de kaas 56
3. De invloed van de pH van de kaas 56
4. De invloed van de bewaringstemperatuur 57
5. Het voortschrijden van de vetsplitsing 57

HOOFDSTUK VIII. Praktijkproeven over de verbetering van de smaak van kaas 58
1. Methode 58
2. Resultaten 59

SAMENVATTING 59
SUMMARY 63
LITERATUUR 66

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Kaas wordt vooral gegeten, omdat hij behalve voedzaam smakelijk is. De kaas die vroeger op de boerderij werd gemaakt, is zeker pikant van smaak geweest. Men had in die dagen echter veel met gebreken te kampen. Toen later de kaasbereiding van de boerderij naar de fabriek was verplaatst, werd er naar gestreefd een zo uniform mogelijk product te bereiden. Men is daar zeer zeker in geslaagd en het is thans mogelijk, zonder veel kans op mislukking, kaas van goede kwaliteit te bereiden. Uniformeren geeft echter bijna altijd aanleiding tot vervlakking. Ook hier trad een duidelijke vervlakking van de smaak aan de dag. Het is daarom een actueel vraagstuk op welke wijze men er in zou kunnen slagen, volgens de moderne methoden kaas te maken die niet alleen vrij is van gebreken, doch ook bijzonder smakelijk is.

In de laatste vijftig jaren heeft men veel onderzoek over de kaasrijping verricht. Vooral is daarbij aandacht besteed aan de gebreken. In mindere mate is de vorming van de gewenste smaakstoffen bestudeerd. MULDER (1947 en 1952) gaf een overzicht van de bestanddelen van kaas die tot de smaak bijdragen. De belangrijkste van deze componenten zijn het zout, de eiwitten en de daaruit gevormde producten, de melksuiker en de daaruit gevormde verbindingen o.a. melkzuur, de vetten en de daaruit gevormde stoffen. Vooral aan de afbraakproducten van de eiwitten heeft men veel aandacht besteed. Ook de afbraak van melksuiker en melkzuur werd uitvoerig bestudeerd, vooral in verband met het ontstaan van gebreken. Het vet en de daaruit gevormde vetzuren werden veelal buiten beschouwing gelaten. Toch is dit onjuist, want zij dragen zeker bij tot de smaak van kaas. In de laatste jaren heeft men meer aandacht besteed aan de omstandigheden die invloed hebben op het vrijkomen van vetzuren. De oorzaak van deze vethydrolyse bleef echter onbekend.

Het doel van dit onderzoek was te trachten de oorzaak van de genoemde vethydrolyse op te sporen, een verklaring te zoeken voor de invloed op deze vetsplitsing van allerlei omstandigheden die zich bij de kaasbereiding en -bewaring voordoen, en na te gaan in hoeverre een bewuste regeling van de vetsplitsing zou kunnen bijdragen tot kwaliteitsverbetering.

HOOFDSTUK II

ENIGE WAARNEMINGEN BETREFFENDE DE ONTLEDING VAN HET VET TIJDENS DE KAASRIJPING

1. HET AANTONEN VAN VETSPLITSING IN KAAS

Het is niet moeilijk vast te stellen, of tijdens de kaasrijping vet is gehydrolyseerd. De vetzuren immers, die daarbij vrijkomen, geven aan de kaas een pikante smaak. Zij maken het geheel van de kaassmaak voller en door hun typische reuk vallen zij bij een organoleptische keuring direct op.

Het is ook op een eenvoudige wijze mogelijk met behulp van een chemische methode vetsplitsing in kaas aan te tonen. Men bepaalt daartoe meestal het zuurgetal van het kaasvet. Bij het hier beschreven onderzoek werd dit vet ver-

kregen door gelijke gewichtshoeveelheden gemalen kaas en gewassen, gegloeid zand tot een temperatuur van 50°C te verhitten en daarna uit te persen (BARTHEL, 1928; RAADSVELD en MULDER, 1949). Dit kan gemakkelijk geschieden in een dikwandige metalen cylinder, waarvan de bodem geperforeerd is. Het uitgeperste vet wordt door centrifugeren en filtreren van de overige kaasbestanddelen gescheiden. De bepaling van het zuurgetal werd uitgevoerd door een gewogen hoeveelheid van het gefiltreerde vet op te lossen in een mengsel van gelijke delen alcohol en aether en te titreren met alcoholische NaOH 0,1 N. Phenolphtaleïne dient hierbij als indicator (Normblad N 1046 – 50 blz. 37). Onder het zuurgetal wordt verstaan het aantal ml NaOH 0,1 N nodig voor het neutraliseren van 10 gram vet.

2. DE SMAAK VAN KAAS EN HET ZUURGETAL VAN HET VET

Door MULDER (1952) is er reeds op gewezen, dat bij een goede kaas de verschillende componenten van de smaak met elkaar in evenwicht zijn. Zo zal een kaas waarin de andere bestanddelen dan het vet tijdens de rijping in een belangrijke mate zijn ontleed, alleen dan een goede smaak bezitten, als het vet in een dienovereenkomstige mate is ontleed. Is de hoeveelheid vetzuren te gering, dan is de kaas niet pikant; is zij te groot, dan is de kaas dikwijls rans-bitter van smaak. Dit houdt in, dat het bepalen van het zuurgetal van het kaasvet wel een goede maat is voor de vetontleding in kaas maar niet voor de smaak van de kaas. Steeds moet worden nagegaan, in hoeverre de vrijgekomen vetzuren inderdaad tot de smaak van de kaas bijdragen. Dit kan slechts zintuiglijk geschieden.

3. DE INVLOED VAN HET PASTEURISEREN VAN DE TE VERKAZEN MELK

Het is algemeen bekend, dat kaas uit gepasteuriseerde melk minder smakelijk is dan kaas uit rauwe melk. Voor Nederlandse kaas is hierop vooral gewezen door VAN DAM (1928). LANE en HAMMER (1939) vonden, dat pasteurisatie van de kaasmelk de vetsplitsing in Cheddarkaas belangrijk verminderde. MULDER (1947) vond hetzelfde bij een aantal Nederlandse kazen. Hij veronderstelde, dat hier misschien een gedeeltelijke verklaring zou kunnen worden gevonden voor het minder smakelijk zijn van kaas uit gepasteuriseerde melk.

Het is ons gebleken, dat een verhitting van de kaasmelk gedurende een half uur op een temperatuur van 64°C invloed heeft op de vetontleding in kaas. Bij verdere proefnemingen bleek, dat zelfs een verhitting van de melk tot 55°C gevolgd door een snelle afkoeling reeds van invloed is. In tabel 1 is weergegeven, hoe de smaak en het zuurgetal van het vet in dergelijke kazen veranderden tijdens de rijping. Ter vergelijking is aangegeven, hoe kaas bereid uit een andere portie van dezelfde melk die niet werd gepasteuriseerd, rijpte. Ofschoon dit niet nader is aangegeven zijn hier, evenals bij de volgende proefnemingen, de verdere omstandigheden bij de rijping en bereiding zo goed mogelijk gelijk gehouden. Kortheidshalve zij volstaan met deze twee voorbeelden uit ons cijfermateriaal.

Voor de praktijk volgt hieruit de belangrijke conclusie, dat een verhitting tot dusdanig lage temperaturen, dat eigenlijk niet van een pasteurisatie kan worden gesproken, reeds een duidelijke invloed op de vetsplitsing kan hebben.

4. DE INVLOED VAN HET GEWICHT EN DE VORM VAN DE KAAS

Het is ons gebleken, dat er vaak een groot verschil bestaat in de stijging van

TABEL 1. *De invloed van de pasteurisatietemperatuur*

Duur van de rijping	Rauw		Verhit gedurende 30 min. op 64 °C		Rauw		Verhit tot 55 °C en dadelijk afgekoeld	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	3,1	kaassmaak; goor	1,4	goed			0,7	goed
10 weken	5,0	kaassmaak; goor	2,2	geen kaassmaak	2,4	kaassmaak; iets onzuiver	1,3	weinig kaassmaak; onzuiver
20 weken	7,3	kaassmaak; branderig	3,2	heel weinig kaassmaak			1,8	enige kaassmaak
30 weken	8,6	kaassmaak; bitter	3,9	weinig kaassmaak	5,2	te scherpe kaassmaak; onzuiver	2,6	enige kaassmaak; onzuivere bijsmaak

TABEL 2. *Vethydrolyse in kazen van verschillend gewicht en verschillende vorm*

Duur van de rijping	Lunchkaas 633 gram		Edammer kaas 2100 gram		Goudse kaas 2220 gram		Goudse kaas 6200 gram	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
20 weken	8,3	zeer goede kaassmaak; iets pikanter dan de Goudse	6,6	goede kaassmaak; iets zout	6,0	iets te zout; iets bitter	5,4	zeer goede kaassmaak; smaak van boerenkaas
30 weken	16,1	goed; zuivere kaassmaak	13,9	goede kaassmaak; iets te zout	11,1	kaassmaak; iets te pikant; iets te zout	7,5	goede kaassmaak; iets te zoet

het zuurgetal van het vet in de rand en van het vet in het middengedeelte van de kaas. Ook blijkt uit tabel 2 dat, wanneer er kaas van verschillende vorm en grootte bereid wordt uit dezelfde melk, in de kleinste kaas de grootste stijging van het zuurgetal optreedt.

Bij ons onderzoek is steeds gebruik gemaakt van baby Edammers (1 kg), bereid uit volle melk, tenzij anders wordt vermeld.

5. De invloed van de pH

Aan Raadsveld en Mulder (1949) bleek dat, wanneer kazen bereid werden uit dezelfde melk, maar met verschillende pH, de kazen met de laagste pH de meeste vetontleding vertoonden. Tabel 3 geeft aan, dat dit resultaat ook door ons werd gevonden. De verschillen waren niet altijd groot. In verband hiermede wijzen wij op de praktijkwaarneming, dat een kaas die aan de korte kant is, in het algemeen pikanter van smaak is dan een kaas met een hoge pH.

Tabel 3. *De invloed van de pH op de vetontleding*

Duur van de rijping	pH	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	pH	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
A						
3 weken	4,99	1,9	goede kaassmaak; iets zuur	5,15	1,8	goede kaassmaak; zuiver van smaak
10 weken	5,11	3,4	zeer goede kaassmaak, scherper dan de kaas met hoge pH; vetzuurlucht	5,29	3,1	kaassmaak; minder vol en zuiver van smaak
20 weken	5,21	6,3	pikante kaassmaak; flinke vetzuurlucht	5,35	5,1	vetzuurlucht; kaassmaak; iets goor
30 weken	5,29	14,7	te scherpe kaassmaak; vetzuurbitter; sterke vetzuurlucht	5,44	8,9	flinke kaassmaak; iets goor; vetzuurlucht
B						
3 weken	5,00	1,6	goede kaassmaak	5,18	1,5	enige kaassmaak; iets zoet
10 weken	5,13	2,3	enige kaassmaak; goor	5,29	2,2	enige kaassmaak; zoet
20 weken	5,24	3,5	kaassmaak; iets zout	5,42	3,3	enige kaassmaak
30 weken	5,31	5,6	pikante kaassmaak	5,51	5,2	vrij pikante kaassmaak; iets goor

6. De invloed van de consistentie

De consistentie van de kaas kan een grote invloed hebben op de smaak. Kaas die is fijngewreven, heeft een andere smaak dan het niet fijngewreven product. Mulder (1952), die hierop wees, vermeldde, dat in sommige gevallen, vooral bij kaas met een taai zuivel, vrij grote hoeveelheden in de kaas voorkomende vrije vetzuren slechts nauwelijks kunnen worden waargenomen bij het

proeven, doch dat zij heel duidelijk kunnen worden geproefd, als de kaas vooraf wordt fijngewreven.

Hieruit volgt, dat er rekening mee moet worden gehouden, dat bij aanwezigheid van eenzelfde hoeveelheid vrije vetzuren bij het ene soort zuivel meer smaak kan worden waargenomen dan bij een ander soort zuivel. Na wrijven in een mortier kan dit verschil geheel verdwenen zijn.

7. De invloed van de temperatuur waarbij de kaas rijpt

Raadsveld en Mulder (1949) vonden, dat bij een lage bewaringstemperatuur een geringere vetontleding optreedt dan bij een hoge. In tabel 4 blijkt, dat deze waarneming door ons werd bevestigd.

Tabel 4. *De invloed van de temperatuur op de vetontleding*

Duur van de rijping	Bewaringstemperatuur 15 à 17°C		Bewaringstemperatuur 5 à 6°C	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
2 weken	1,1	goede smaak; iets bitter	1,1	goede smaak; iets bitter
10 weken	2,9	zuur	2,0	zuur
20 weken	5,0	kaassmaak; zuur	2,8	zuur; weinig kaassmaak
30 weken	6,7	kaassmaak	3,3	kaassmaak; zuur en bitter

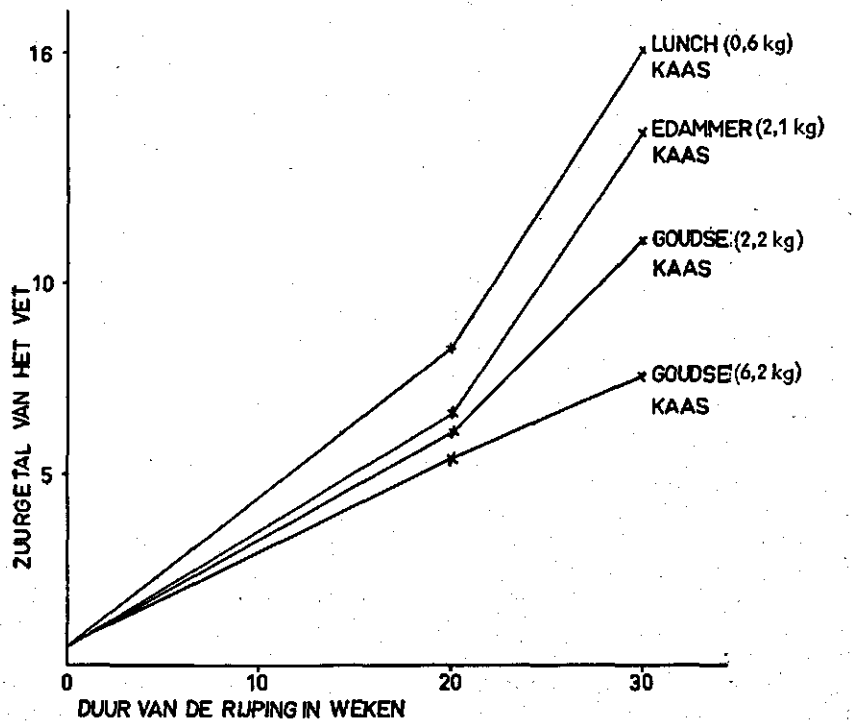

Fig. 1. Vethydrolyse in kazen van verschillend gewicht en verschillende vorm

8. HET VOORTSCHRIJDEN VAN DE VETSPLITSING

De vetsplitsing in kaas verloopt volgens RAADSVELD en MULDER (1949) rechtlijnig met de tijd. Dit is niet in overeenstemming met de waarneming van LANE en HAMMER (1939), die vonden, dat de vethydrolyse in Cheddarkaas na 6 maanden maximaal is en het zuurgetal daarna ongeveer constant blijft.

Uit de vele waarnemingen die wij omtrent dit vraagstuk hebben verricht volgt duidelijk, dat de vethydrolyse zo goed als rechtlijnig met de tijd verloopt. Bij kleine kazen namen wij echter een afwijking van deze regel waar. Als deze gedurende een lange tijd werden bewaard, traden relatief sterkere stijgingen op. In figuur 1 blz. 7 blijkt, hoe het zuurgetal stijgt in afhankelijkheid van de tijd. In de figuur zijn de gegevens van tabel 2 weergegeven. In tegenstelling met de overige proefnemingen werd bij deze proef vóór het onderzoek van het kaasvet de rand van de kaas (0,5 cm) niet verwijderd.

HOOFDSTUK III

ENZYMEN DIE IN KAAS ONTLEDING VAN VET KUNNEN VEROORZAKEN

De enzymen die van invloed zouden kunnen zijn op de vetsplitsing in kaas, zou men als volgt kunnen indelen in:

1. enzymen die afkomstig zijn van het stremsel.
2. enzymen die van origine in de melk aanwezig zijn.
3. enzymen die afkomstig zijn van micro-organismen.

Verder zal wat deze laatstgenoemde enzymen betreft met de volgende mogelijkheden rekening moeten worden gehouden.

a. de enzymen worden door de levende bacteriën in de melk gevormd.
b. de enzymen zijn afkomstig van bacteriën die zich in kaas ontwikkelen.
c. de enzymen zijn afkomstig van micro-organismen die op het kaasoppervlak groeien.

1. DE INVLOED VAN HET STREMSEL

a. Stremsel bevat geen lipase

Het lijkt niet waarschijnlijk, dat Nederlands handelsstremsel een belangrijke invloed heeft bij de vetsplitsing in kaas. Kaas immers die bereid wordt uit gepasteuriseerde melk, vertoont meestal slechts een geringe vethydrolyse, niettegenstaande bij de bereiding vaak meer stremsel wordt gebruikt dan bij de bereiding van kaas uit rauwe melk.

Wij hebben getracht met een eenvoudig proefje deze veronderstelling te bevestigen. Hierbij werd 15 ml Nederlands handelsstremsel, verdund met 15 ml gedestilleerd water, met 10 ml botervet in een daarvoor geschikt waterbad gedurende resp. 24, 48 en 72 uren intensief gemengd. De temperatuur van het waterbad werd op 30 °C gehouden. Ter vergelijking werd tegelijkertijd eenzelfde proef ingezet, waarbij de buizen met stremsel en vet vooraf gedurende 10 minuten in een kokend waterbad werden verhit teneinde een eventueel aanwezig vetsplitsend enzym te vernietigen. In tabel 5 is vermeld, hoe het zuurgetal van het vet veranderde gedurende de genoemde incubatietijden.

Uit de tabel volgt, dat het botervet weliswaar enig zuur uit het stremsel opneemt, maar dat hier van een lypolytische activiteit geen sprake is. Het gebruikte Nederlands handelsstremsel bevatte dus geen lipase.

TABEL 5. *De lypolytische activiteit van stremsel*

Duur van de proef	Mengsel verhit; Zuurgetal van het vet	Mengsel niet verhit; Zuurgetal van het vet
0 uren	0,8	0,8
24 uren	1,0	1,1
48 uren	1,3	1,2
72 uren	1,2	1,2

b. Stremsel oefent geen indirecte invloed uit op lipasen die in melk aanwezig zijn

Een lipase afkomstig van de zaden van Ricinus communis met een optimale werking bij pH 4,7 kan volgens WILLSTÄTTER (1924) door pepsine worden omgezet tot een lipase met een pH optimum van 6,8–8,0. Het is denkbaar, dat stremsel melklipase, met een pH optimum 8,5, omzet tot een enzym dat een optimale werking bij omstreeks pH 5 heeft. Indien dit zo zou zijn, dan zou in room na verloop van tijd de lipase-activiteit bij een pH 5,0 toenemen, indien aan dit monster stremsel wordt toegevoegd. Er werden twee series monsters room weggezet bij 15°C. De pH van de room was 5,30. Ter conservering werd 5% chloroform toegevoegd. Aan de ene serie werd 0,8 ml stremsel per 130 ml room, aan de andere serie geen stremsel toegevoegd. De veranderingen van het zuurgetal van het roomvet en van de pH van de room zijn in tabel 6 weergegeven.

TABEL 6. *Over de invloed van stremsel op de activiteit van melklipase*

Duur van bewaring van de room	Met stremsel		Zonder stremsel	
	pH	Zuurgetal van het vet	pH	Zuurgetal van het vet
0 dagen	5,30	0,3	5,30	0,3
3 dagen	5,35	0,5	5,37	0,6
7 dagen	5,33	0,6	5,34	0,6
16 dagen	5,20	0,9	5,26	0,8

Uit de tabel volgt, dat stremsel de optimale werking van melklipase niet verschuift naar een gebied van lagere pH.

2. DE ENZYMEN DIE VAN ORIGINE IN DE MELK AANWEZIG ZIJN

a. Enige proeven met „aseptisch" gewonnen melk

Wil men de invloed van die enzymen welke van origine in de melk aanwezig zijn, bij de kaasrijping kunnen bestuderen, dan zal men kaas moeten bereiden uit melk, waarin geen andere enzymen aanwezig zijn. Men zal dus aseptisch gewonnen melk moeten gebruiken en bij de kaasbereiding elke infectie moeten vermijden.

De melk komt echter niet steriel uit de uier. In de tepelgangen vindt reeds infectie van de melk plaats. Verdere infectiebronnen zijn: de koe (vooral de uier), de melker (vooral de handen), het melkmateriaal en de omgevende atmosfeer. Men kan reeds bij voorbaat zeggen, dat het onmogelijk is steriele melk te winnen. Toch kan men door het nemen van talrijke voorzorgen een product winnen dat nagenoeg vrij is van vethydrolyserende kiemen. Wij hebben getracht dit op de volgende wijze te bereiken. Het melkmateriaal werd, verpakt

in papier, gesteriliseerd. De uier van de koe werd grondig met zeep gewassen en met schoon water en verdunde chloorbleekloog gespoeld. De melker werd gekleed in een steriele overall. De handen werden grondig met water, zeep en verdunde chloorbleekloog gereinigd. De uier van de koe en de handen van de melker werden daarna met een steriele handdoek afgedroogd. De eerste melkstralen werden weggemolken. Na het melken werd de „aseptisch" gewonnen melk zo spoedig mogelijk tot kaas verwerkt. Ook hierbij werd uitsluitend gebruik gemaakt van gesteriliseerd materiaal. Het is ons gelukt kaas te bereiden uit melk die nagenoeg vrij was van belangrijke vethydrolyserende microorganismen.

In tabel 7 is weergegeven, hoe in deze kaas het zuurgetal van het vet en de smaak met de duur van de rijping veranderen. Ter vergelijking is de rijping nagegaan van kaas bereid uit melk die op meer normale wijze werd gewonnen. In dezelfde tabel is opgenomen het aantal vethydrolyserende bacteriën, dat de „aseptisch" gewonnen en de zonder speciale voorzorgen gewonnen melk bevatten. Dit aantal werd bepaald met de grote-plaatmethode. De voedingsbodem bestond uit: 1% trypton, 1% tributyrine en 2% agar-agar. Met melkzuur werd de voedingsbodem op een pH 5,6 gebracht.

Bij deze proeven was de vetsplitsing in de kaas bereid uit de „aseptisch" gewonnen melk belangrijk kleiner dan bij de kazen uit de zonder speciale voorzorgen gewonnen melk. Toch had ook in de kaas uit de „aseptisch" gewonnen melk nog een duidelijk aantoonbare vetsplitsing plaats. Het lijkt redelijk deze vetsplitsing toe te schrijven aan de in deze „aseptisch" gewonnen melk aanwezige melklipase(n). Hiertegen kan men natuurlijk gemakkelijk aanvoeren, dat ook in dit geval de vetsplitsing moet worden toegeschreven aan de weinige vetsplitsende microorganismen, die ondanks de genomen voorzorgen nog aanwezig waren. Als men alles echter beziet in verband met de verder nog te beschrijven proefnemingen, wordt het tegenargument minder verdedigbaar.

b. Melklipase vertoont activiteit bij de pH van kaas

Het is uit de literatuur bekend, dat melk van nature één of meer enzymen bevat. Er is daarbij veel onderzoek verricht omtrent de invloed van de pH op de activiteit van melklipase. Als men het geheel van de gegevens overziet, dan heerst er weinig eenstemmigheid omtrent de mate waarin de pH de activiteit van melklipase beïnvloedt. Het leek ons daarom nuttig de invloed van de pH op de activiteit van melklipase nogmaals aan een nader onderzoek te onderwerpen. De proefnemingen en de resultaten daarvan zullen slechts summier behandeld worden, omdat wij elders op deze kwestie nog uitvoerig hopen terug te komen.

Wij hebben getracht met proeven, waarbij in monsters room de stijging van het zuurgetal van het vet werd nagegaan, de invloed van de pH nader te bestuderen. Om er zeker van te zijn ook hier niet te doen te hebben met enzymen van microbiologische oorsprong, leek het ons gewenst ook nu weer uit te gaan van „aseptisch" gewonnen melk. Met behulp van een kleine handcentrifuge werd uit zulke melk room bereid. De centrifuge werd vooraf gesteriliseerd. De room werd opgevangen in een steriel glas en verdeeld over een aantal stopflesjes, waarna melkzuur werd toegevoegd om de gewenste pH te bereiken. Ter conservering werd 5% chloroform toegevoegd. (Tabel 8 bevat de resultaten van een van de proeven waarin de stijging van het zuurgetal van het roomvet bij pH 5,0 werd vergeleken met de stijging bij pH 6,0). Het kiemgetal van de gebruikte

TABEL 7. *De rijping van kaas bereid uit „aseptisch" gewonnen melk*

Duur van de rijping in weken	„Aseptisch" gewonnen melk		Zonder speciale voorzorgen gewonnen melk	
A	Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 30/ml		Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 164000/ml	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas *	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3	1,5	goed; geen kaassmaak	2,4	bitter
8	2,1	enige kaassmaak	3,4	sterk en bitter
20	2,4	geen kaassmaak; iets zout; iets bitter	5,0	sterk; bitter
30	2,9	weinig kaassmaak; zout	7,3	kaassmaak; bitter
B	Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 33/ml		Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 133000/ml	
3	1,5	goed; geen kaassmaak	4,8	enige kaassmaak; iets zuur
10	2,2	enige kaassmaak	9,7	Vrij scherpe kaassmaak
20	4,8	weinig kaassmaak; groot verschil met de normale; iets zout	15,8	te scherpe kaassmaak; vetzuurbitter
C	Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 310/ml		Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 5200000/ml	
3	2,0	goed	2,1	goor
10	2,5	neutraal	3,2	kaassmaak; goor
20	2,9	weinig kaassmaak; iets zout	3,9	kaassmaak; bitter
30	3,5	weinig kaassmaak; iets zout	4,7	kaassmaak; zout; bitter
D	Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 20/ml		Aantal vethydrolyserende micro-organismen: 52000/ml	
3	1,6	goed; geen kaassmaak	1,9	weinig kaassmaak; iets goor
40	5,5	kaassmaak; iets zout	15,7	sterke kaassmaak; zout; vetzuurbitter

room bedroeg 120 per ml; vetsplitsende micro-organismen waren niet aantoonbaar (zie ook figuur 2 blz. 12).

TABEL 8. *De invloed van de pH op de activiteit van melklipase*
Aantal vetsplitsende bacteriën per ml melk: niet aantoonbaar.
Aantal kiemen: 120 per ml melk.

Duur van de bewaring der monsters room	pH 6,0 Zuurgetal van het vet	pH 5,0 Zuurgetal van het vet
0 dagen	0,5	0,5
21 dagen	2,0	1,7
42 dagen	2,8	2,2

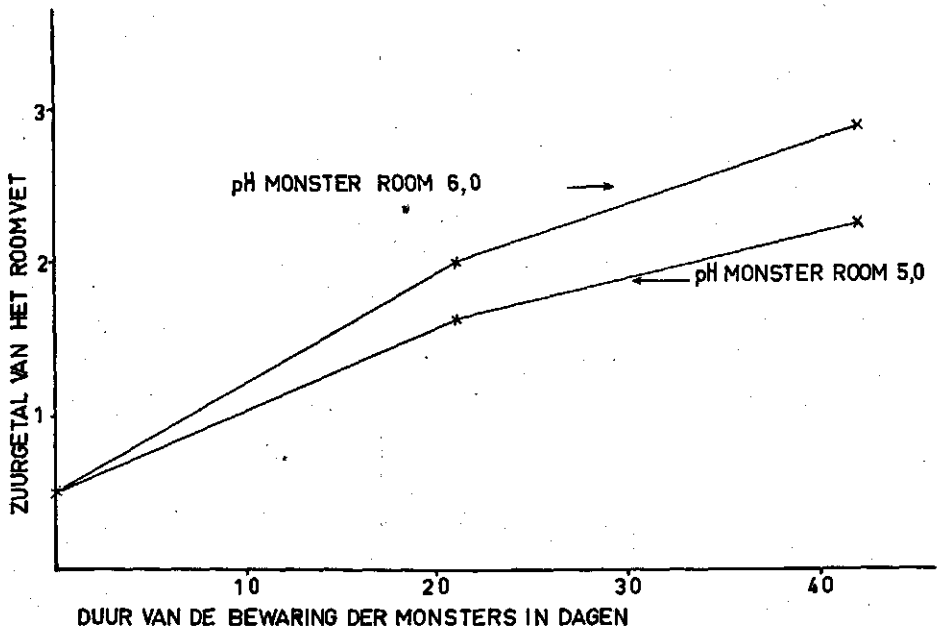

FIG. 2. De invloed van de pH op de activiteit van melklipase

Uit de gegevens kan worden geconcludeerd, dat er in melk van origine een vethydrolyserend enzym aanwezig is dat werkzaam is bij een pH 5,0. De activiteit van melklipase bij pH 6 is echter groter dan bij pH 5. Er zij op gewezen, dat deze proeven met melk en room werden uitgevoerd en dat men de resultaten niet klakkeloos mag overbrengen op kaas. De zuurtegraad heeft nl. niet alleen invloed op de toestand van het enzym maar ook op de toestand van het substraat.

c. De invloed van keukenzout op de activiteit van melklipase

Keukenzout kan volgens een onderzoek van GOULD (1941) remmend werken op de activiteit van melklipase. In monsters room, bereid uit „aseptisch" gewonnen melk, hebben wij eenzelfde remmende invloed kunnen aantonen. Tabel 9 geeft een overzicht van de resultaten. Twee series monsters room werden op

TABEL 9. *Invloed van zout op de activiteit van melklipase in room*
Aantal vetsplitsende bacteriën per ml melk: 380.
Aantal kiemen: 750 per ml melk.

Hoeveelheid zout in grammen per 100 ml room	pH	Zuurgetal van het vet		pH	Zuurgetal van het vet	
		begin	na 10 dagen		begin	na 10 dagen
0	6,15	0,4	3,3	5,09	0,4	1,9
1	6,10	0,4	2,4	5,02	0,4	1,4
2	6,16	0,4	2,4	5,00	0,4	1,3
5	6,10	0,4	1,5	4,99	0,4	1,2
8	6,20	0,4	1,5	4,98	0,4	1,1
10	6,18	0,4	1,7	4,94	0,4	1,4

een pH van 6,1 en 5,0 gebracht en bedeeld met verschillende hoeveelheden zout. Bij geringe concentratie (0–2%) oefende het keukenzout een duidelijke remmende werking uit op de vetsplitsing in room. Bij hogere concentraties (hoger dan 5%) wordt deze remmende invloed niet groter. Dit geldt zowel voor de serie die een hoge pH heeft, als voor de serie die een lage pH bezit. Uit de proeven volgt ook, dat melklipase bij zoutconcentraties, die in kaas voorkomen, werkzaam kan zijn.

Indien melklipase mede verantwoordelijk is voor de vetontleding tijdens de kaasrijping dan zal zout eenzelfde invloed moeten hebben op de vetontleding tijdens de kaasrijping als op de vetsplitsing in room. Tabel 10 (blz. 14) bevat de resultaten van enige proeven met kazen met verschillend zoutgehalte. Onder A is te zien, dat zout remmend werkt bij lage concentraties. Onder B blijkt, dat bij hogere concentraties de remmende invloed van het zout niet groter wordt, ja zelfs iets geringer schijnt te kunnen worden. Zonder verdere proefnemingen kan moeilijk een verklaring worden gegeven voor de invloed van hoge zoutconcentraties. Mogelijk moet een verklaring worden gezocht bij de invloed van het zout op de pH, de consistentie of de aantastbaarheid van het vet.

De proeven zijn echter niet in tegenspraak met de opvatting, dat melklipase mede verantwoordelijk is voor de vetsplitsing in kaas.

d. Enige proeven waarbij getracht werd melklipase op te hopen

De eigenschappen van melklipase zouden het beste kunnen worden bestudeerd met een zuiver preparaat van het enzym. Een dergelijk preparaat is echter niet bekend en zal hoogstwaarschijnlijk niet gemakkelijk kunnen worden bereid. Wel is het mogelijk gebleken het enzym op te hopen. Bij een oriënterende proef bereidde MULDER (1947) uit room die verkregen werd door gekoelde rauwe melk bij een temperatuur van 10°C te centrifugeren, boter, die na bewaring meer ranzig-sterk van smaak werd dan de boter bereid uit room die verkregen werd door een andere portie van dezelfde melk bij 40°C te centrifugeren. Het vet van de eerst genoemde boter had na de bewaring een hoger zuurgetal dan dat van de laatstgenoemde. Deze waarneming zou kunnen worden verklaard met de veronderstelling, dat melklipase bij een lage temperatuur (b.v. 10°C) beter door de vetbolletjes wordt vastgehouden dan bij hogere temperaturen (b.v. 40°C), zodat de bij 10°C gewonnen room meer lipase zal bevatten dan de bij 40°C verkregen room. Mengt men nu de bij lage temperatuur verkregen room (K.R.) met de bij hogere temperatuur gewonnen ondermelk (W.O.) en omgekeerd, dan zal men dus melk verkrijgen met „veel" en melk met „weinig" melklipase. De mengsels worden aangegeven met resp. K.R. + W.O. en W.R. + K.O. Wij hebben kunnen aantonen, dat het mengsel K.R. + W.O. inderdaad meer melklipase bevat dan het mengsel W.R. + K.O. In room bereid bij 20°C uit het mengsel K.R. + W.O. trad nl. bij een pH 6,6 maar ook bij een pH 5,0 een grotere stijging van het zuurgetal van het roomvet op dan in de room bij 20°C bereid uit het mengsel W.R. + K.O. Tabel 11 geeft dit aan.

De proeven werden uitgevoerd met „aseptisch" gewonnen melk, zodat hier nagenoeg alleen melkenzymen aanwezig waren. De monsters room werden op de gebruikelijke wijze (blz. 9) geconserveerd met 5% chloroform. In de tabel is verder het aantal in de melk voorkomende, vetsplitsende micro-organismen vermeld.

TABEL 10. *Invloed van het zoutgehalte op de vetontleding in kaas*

A	Geen zout toegevoegd				Zeer laag zoutgehalte				Laag zoutgehalte				Normaal zoutgehalte			
Duur van de rijping	pH	Zuur-getal v/h vet	Zout% v/h vocht	Smaak van de kaas	pH	Zuur-getal v/h vet	Zout% v/h vocht	Smaak van de kaas	pH	Zuur-getal v/h vet	Zout% v/h vocht	Smaak van de kaas	pH	Zuur-getal v/h vet	Zout% v/h vocht	Smaak van de kaas
21 dagen	5,20	2,3	0,19	goor; zoet; bitter	5,18	2,1	0,81	goor; zoet	5,10	1,9	1,89	enige kaas-smaak; flauw	5,07	2,0	3,46	enige kaas-smaak; iets flauw
37 dagen	5,34	2,8	0,24	goor; zoet; bitter	5,32	2,5	1,07	goor; zoet	5,22	2,5	2,69	enige kaas-smaak; goor	5,10	2,3	4,40	kaas-smaak; goor

B	Normaal zoutgehalte				Hoog zoutgehalte				Zeer hoog zoutgehalte			
2 weken	4,80	1,4	3,80	iets flauw	4,80	1,4	5,39	iets zout	4,84	1,0	7,49	zout
10 weken	5,06	2,5	3,60	goed	5,02	2,4	6,07	iets zout	5,03	2,9	7,56	zout
20 weken	5,36	4,3	4,88	pikante smaak	5,32	4,2	7,18	kaas-smaak	5,27	5,0	10,34	kaas-smaak; zout
30 weken	5,45	6,0	6,00	zoetachtige smaak; minder fijne kaas-smaak	5,40	6,7	8,98	iets scherpe kaas-smaak	5,30	8,1	11,40	goede kaas-smaak; zout

TABEL 11. *Een vergelijking van de lipase-activiteit van de mengsels W.R. + K.O. en K.R. + W.O.*

W.R. + K.O.				K.R. + W.O.			
Tijd van bewaren van de monsters room	pH	Aantal vetsplitsers/ml; direct	Zuurgetal van het vet	Tijd van bewaren van de monsters room	pH	Aantal vetsplitsers/ml; direct	Zuurgetal van het vet
A. 15 dagen	6,50	40	5,1	15 dagen	6,50	20	6,9
B. 14 dagen	6,50	160	6,2	14 dagen	6,50	160	7,0
C. 0 dagen	6,63	10	0,5	0 dagen	6,63	90	0,5
21 dagen	6,63		5,9	21 dagen	6,63		9,2
0 dagen	5,03	10	0,5	0 dagen	5,03	90	0,5
21 dagen	5,03		0,9	21 dagen	5,03		3,1

Uit de waarneming, dat in room van het mengsel K.R. + W.O. zowel bij pH 6,6 als bij pH 5,0 een sterkere vetsplitsing optrad, dan in room van het mengsel W.R. + K.O., kan worden geconcludeerd, dat in het eerstgenoemde mengsel inderdaad meer lipase voorkwam.

Uit dezelfde mengsels melk hebben wij kaas bereid. Het vet werd in de verkregen kaassoorten verschillend sterk afgebroken (tabel 12).

TABEL 12. *Invloed van de hoeveelheid melklipase op de vethydrolyse in kaas*

	Mengsel W.R. + K.O.		Mengsel K.R. + W.O.	
A	Aantal vetsplitsers: 160/ml		Aantal vetsplitsers: 160/ml	
Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
6 weken	3,0	enige kaassmaak; iets branderig	5,2	kaassmaak; duidelijk verschil met kaas uit W.R. + K.O.
B	Aantal vetsplitsers: 40/ml		Aantal vetsplitsers: 20/ml	
6 weken	2,5	geen kaassmaak; bitter	4,7	weinig kaassmaak; bitter
25 weken	5,5	bitter; slechte smaak	12,1	kaassmaak; bitter

In de kaas met de grootste hoeveelheid melklipase vindt de sterkste vetsplitsing plaats. Indien men veronderstelt, dat in de mengsels K.R. + W.O. en W.R. + K.O., wat de vetontleding in kaas betreft, overigens gelijke omstandigheden heersen, dan zijn deze proeven een bijzonder fraaie illustratie van de opvatting, dat de melklipase in staat is in kaas vet af te breken.

e. Vernietiging van lipase door pasteurisatie van de melk en vetontleding van de kaas

De invloed van melklipase bij de kaasrijping werd ook bestudeerd door de kaasmelk tot bepaalde temperaturen te verhitten en de overblijvende lipolytische activiteit in verband te brengen met de vetafbraak in de kaas bereid uit dezelfde melk. Op dezelfde wijze werd het gehalte aan melklipase in de niet verhitte melk vergeleken met de vetafbraak in kaas bereid uit rauwe melk. De verhitting van de melk werd uitgevoerd door stoom in de dubbele wand van de kaasbak te

blazen. Nadat de melk gedurende een bepaalde tijd op temperatuur was gehouden, werd zij gekoeld door koud water door de dubbele wand van de kaasbak te leiden.

Het onderzoek naar de aanwezigheid van melklipase werd als volgt uitgevoerd: Een klein gedeelte van de melk werd gecentrifugeerd, de verkregen room werd gehomogeniseerd, verduurzaamd met 5 % chloroform en gedurende 4 dagen weggezet bij kamertemperatuur. Bij het begin zowel als bij het eind van de proef werd het zuurgetal van het roomvet bepaald. Tabel 13 geeft een overzicht van de resultaten van deze proefnemingen.

TABEL 13. *Vernietiging van lipase door pasteurisatie van de melk en vetontleding van de kaas*

Wijze van verhitten	Stijging van het zuurgetal van het roomvet		Zuurgetal van het kaasvet na 30 weken		Smaak van de kaas	
	Rauw	Gepasteuriseerd	Rauw	Gepasteuriseerd	Rauw	Gepasteuriseerd
I. In 19 min. op 60 °C 0 min. op 60 °C In 30 min. op 30 °C	5,8	0,4	7,6	3,9	Scherp; vetzuur-bitter	enige kaassmaak; iets bitter
II. In 18 min. op 60 °C 3 min. op 60 °C In 23 min. op 30 °C	3,1	2,5	11,6	6,1	vetzuur-bitter	goede kaassmaak
III. In 18 min. op 60 °C 6 min. op 60 °C In 23 min. op 30 °C	3,2	0,6	13,6	12,3	vetzuur-bitter	vetzuur-bitter
IV. In 18 min. op 60 °C 9 min. op 60 °C In 23 min. op 30 °C	3,5	0,6	6,5	3,1	vetzuur-bitter	enige kaassmaak
V. In 15 min. op 55 °C 0 min. op 55 °C In 26 min. op 30 °C	5,0	2,6	5,2	2,6	scherpe kaassmaak	enige kaassmaak
VI. In 16 min. op 55 °C 11 min. op 55 °C In 26 min. op 30 °C	6,4	2,1	5,1	3,1	kaassmaak; iets bitter	enige kaassmaak
VII. In 13 min. op 55 °C 20 min. op 55 °C In 26 min. op 30 °C	5,0	0,3	5,2	2,0	scherpe kaassmaak	geen kaassmaak

In de tabel blijkt, dat wanneer een belangrijk deel van de melklipase was vernietigd meestal een belangrijk lager zuurgetal van het kaasvet werd gevonden. De partij kaas genoemd onder III vormt hierop echter een duidelijke uitzondering. Een mogelijke verklaring zal op blz. 56 gegeven worden.

Wij menen, dat onze proefnemingen de opvatting rechtvaardigen, dat melklipase van invloed is bij de vetontleding, die tijdens de kaasrijping plaats vindt. Aangezien melklipase altijd in rauwe melk voorkomt zal ook bij een zeer hygiënische melkwinning nog altijd enige vethydrolyse in kaas bereid uit deze melk optreden.

3. LIPASEN VAN MICROBIOLOGISCHE OORSPRONG HEBBEN INVLOED OP DE VETSPLITSING IN KAAS

Het is belangrijk bij studies over kaasrijping te beseffen, dat tijdens de bereiding van kaas het milieu voor de micro-organismen zeer sterk verandert. Kaas is door zijn lage pH, zijn hoge zoutconcentratie en zijn lage redoxpotentiaal een geheel ander milieu dan melk. Bovendien is aan het oppervlak van de kaas het milieu weer anders dan in het inwendige van de kaas. In afhankelijkheid van deze drie onderscheiden milieu's nl. de melk, het inwendige van de kaas en het oppervlak van de kaas kan men dan ook drie verschillende flora's verwachten. Wij komen hier in hoofdstuk IV nog nader op terug. Het is dus logisch na te gaan, wat de invloed van deze drie flora's is op de vetontleding die tijdens de kaasrijping plaats vindt. In het voorgaande (blz. 11) is gebleken, dat in kaas bereid uit „aseptisch" gewonnen melk minder vet wordt ontleed dan in kaas bereid uit zonder speciale voorzorgen gewonnen melk. Dit doet veronderstellen, dat behalve melklipase ook vethydrolyserende micro-organismen invloed kunnen hebben bij de vetsplitsing.

a. De micro-organismen die voor de vethydrolyse belangrijk zijn, groeien niet in kaas

Wij hebben er op gewezen, dat de vetontleding nagenoeg rechtlijnig verloopt met de tijd. Dit doet vermoeden, dat de snelheid aan het begin en het eind van de rijping even groot is en dat dus tijdens de rijping weinig of geen lipase wordt gevormd. In hoofdstuk IV zal worden besproken, dat in kaas bacteriën voorkomen die botervet hydrolyseren. Deze bacteriën komen echter in zulk een gering aantal voor of splitsen botervet zo traag, dat zij op de vetsplitsing in kaas geen belangrijke invloed zullen uitoefenen. Wij komen hierop in hoofdstuk IV uitvoerig terug.

In melk daarentegen kan het aantal vetsplitsende bacteriën zeer groot zijn. Toen wij het verband nagingen tussen het aantal vethydrolyserende bacteriën in melk en in daaruit bereide kaas, bleek telkens weer, dat het aantal vetsplitsers in kaas zeer snel daalde.

Na ± 10 weken bevatte de kaas nagenoeg geen vethydrolyserende micro-organismen meer. In figuur 3 (blz. 18) is een voorbeeld gegeven.

b. In een gerijpte kaas bevinden zich geen levende micro-organismen die in belangrijke mate vet in kaas ontleden

Als zich in kaas levende micro-organismen bevinden die voor een belangrijk deel de vetontleding tijdens de kaasrijping veroorzaken, dan zal een suspensie van kaas waarin een sterke vetsplitsing optreedt, aan gepasteuriseerde melk toegevoegd, in de kaas daaruit bereid, vetontleding veroorzaken. Wij hebben dit nagegaan. De suspensie werd bereid door 500 gram zeer goede, pikante boerenkaas te suspenderen in één liter steriel water en 200 ml steriele centrifugemelk. Bij de eerste proef werd bij 70 l gepasteuriseerde melk 5/9 deel van de suspensie gevoegd en daaruit kaas bereid. Een soortgelijke proef werd uitgevoerd door BOEKHOUT en OTT de VRIES (1900) en VAN DAM (1928). Een andere portie van 70 l van dezelfde gepasteuriseerde melk werd gestremd en zonder toevoeging verkaasd. Tijdens de bewerking werd 29,0 l wei afgetapt. Aan het verkregen weiwrongelmengsel werd 1/3 deel van de bovengenoemde kaassuspensie toegevoegd. Wij gebruikten hier slechts 1/3 deel, daar het volume door het wei-

aftappen geringer was geworden. Tenslotte werd 70 l melk verkaasd zonder toevoeging. Tabel 14 bevat een overzicht van de resultaten.

TABEL 14. *Het toevoegen van een kaassuspensie aan gepasteuriseerde kaasmelk (30 min. 64°C)*

Duur van de rijping	Suspensie toegevoegd aan de melk vóór het stremmen		Suspensie toegevoegd aan de weiwrongel		Geen toevoeging	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	1,7	vetsmaak; ranzig	0,9	goor	0,7	flauw
5 weken	2,1	oxydatie-smaak	1,0	goed	0,9	goed
10 weken	3,0	enige kaas-smaak	1,6	goed	1,6	zeer goede fabriekskaas
20 weken	4,6	enige kaas-smaak	2,8	weinig kaas-smaak	2,6	weinig kaas-smaak
30 weken	5,8	enige kaas-smaak	3,8	weinig kaas-smaak	3,6	weinig kaas-smaak

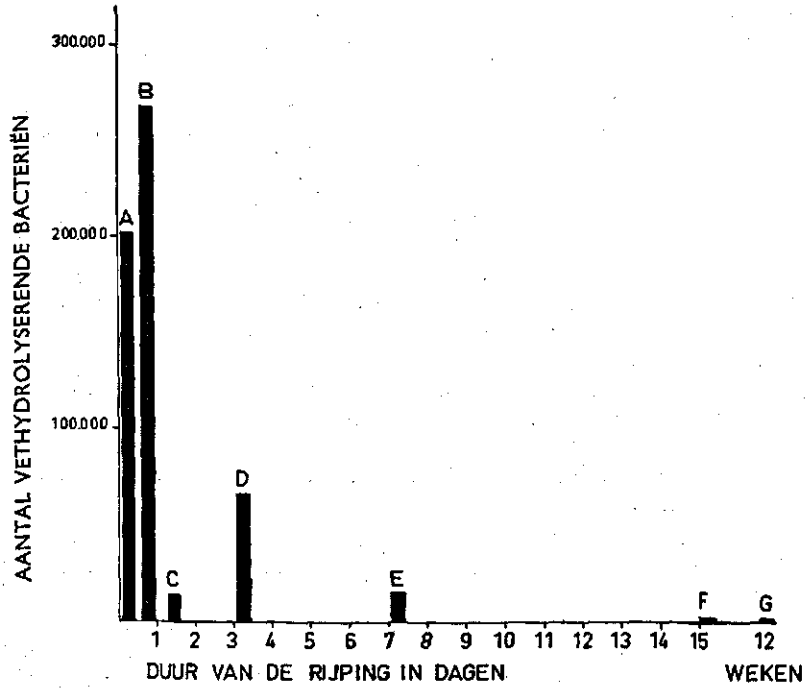

FIG. 3. Aantal vethydrolyserende bacteriën in:
A 1 ml melk
B 0,1 g kaas na het persen
C 0,1 g kaas na het omlopen
D 0,1 g kaas na 3 dagen
E 0,1 g kaas na 7 dagen
F 0,1 g kaas na 15 dagen
G 0,1 g kaas na 12 weken

In deze tabel blijkt, dat door het toevoegen van de kaassuspensie geen belangrijk sterkere vethydrolyse optreedt. In het eerste geval stijgt het zuurgetal

gedurende 30 weken 1,2 eenheden meer dan in kaas uit gepasteuriseerde melk. In het tweede geval vindt er geen stijging van het zuurgetal plaats in vergelijking met dat van de kaas bereid uit de gepasteuriseerde melk. De stijging in het eerste geval kan naar onze mening op een ongedwongen wijze worden verklaard door te veronderstellen, dat de actieve lipase, die ongetwijfeld in de kaassuspensie voorkwam, bij het stremmen van de melk door de kaasstof werd ingesloten, terwijl een insluiting van lipase door de reeds gevormde wrongeldeeltjes bij de tweede proef weinig waarschijnlijk lijkt. Voor het aanwezig zijn van vetsplitsende bacteriën die in kaas kunnen groeien, werd ons inziens geen enkele aanwijzing gevonden.

c. In kaas bereid uit een mengsel van rauwe en gepasteuriseerde melk treedt minder vethydrolyse op dan in kaas bereid uit alleen rauwe melk

In de praktijk wordt vaak kaas bereid uit mengsels van rauwe en gepasteuriseerde melk. Als er tijdens de rijping van kaas uit rauwe melk belangrijke hoeveelheden lipase zouden worden gevormd, dan zou in kaas bereid uit dergelijke mengsels onder bepaalde voorwaarden een nagenoeg gelijke vethydrolyse optreden als in kaas bereid uit geheel rauwe melk. De mengsels bevatten immers zowel de actieve micro-organismen als de stoffen nodig voor de groei van deze organismen. Als een voedingsmedium geënt wordt met bacteriën, dan zal onder normale omstandigheden het aantal bacteriën dat het medium bevat na een zekere incubatietijd, vrijwel onafhankelijk zijn van het entingspercentage. Dit geldt althans, indien de transport- en diffusiemogelijkheden voldoende groot zijn. In hoeverre dit in kaas het geval is, is ons niet bekend.

Wij hebben kaas bereid uit de volgende mengsels:

90 % gepasteuriseerde melk en 10 % rauwe melk
50 % „ „ „ 50 % „ „ (2 maal)
75 % „ „ „ 25 % „ „ (2 maal)
25 % „ „ „ 75 % „ „

Ter vergelijking werd bij ieder mengsel een portie kaas bereid uit alleen rauwe melk. In tabel 15 is vermeld, hoe groot het zuurgetal van het kaasvet was en hoe de kaas smaakte na een rijping van 30 weken.

TABEL 15. *De rijping van kaas bereid uit mengsels van rauwe en gepasteuriseerde melk*
R = rauw. P = gepasteuriseerd.

	Zuurgetal van het vet na 30 weken	Smaak van de kaas na 30 weken		Zuurgetal van het vet na 30 weken	Smaak van de kaas na 30 weken
100% R	4,0	kaassmaak; zout	90% P + 10% R	1,7	weinig kaassmaak; zout
100% R	5,5	kaassmaak; vetzuurbitter; iets zout	50% P + 50% R	3,5	enige kaassmaak; zout
100% R	15,3	te scherpe kaassmaak; vetzuurbitter	50% P + 50% R	9,3	pikante zuivere kaassmaak; iets te scherp
100% R	7,6	scherpe kaassmaak; vetzuurbitter	75% P + 25% R	4,0	weinig kaassmaak; branderig
100% R	7,8	kaassmaak; vetzuurbitter	75% P + 25% R	3,0	enige kaassmaak; iets bitter
100% R	5,3	kaassmaak; vetzuurbitter	25% P + 75% R	3,1	duidelijke kaassmaak; niet vetzuurbitter

Voor de praktijk volgt uit deze proefnemingen, dat men door kaas te bereiden uit mengsels van rauwe en gepasteuriseerde melk, geen kaas kan bereiden waarin het vet even sterk wordt „afgebroken" als in kaas bereid uit alleen rauwe melk. Naarmate het mengsel meer gepasteuriseerde melk bevat, vindt in de daaruit bereide kaas minder vethydrolyse plaats t.o.v. de kaas bereid uit geheel rauwe melk.

Deze proeven versterken onze opvatting, dat er tijdens de rijping geen belangrijke hoeveelheden lipasen worden bijgevormd.

d. De vethydrolyserende bacteriën van rauwe melk

De bovengenoemde onderzoekingen, waarbij bleek, dat de lipolytische bacteriën in kaas afsterven, wezen uit, dat bij het zoeken naar lipasen van microbiologische oorsprong aandacht besteed moet worden aan de vethydrolyserende micro-organismen die zich in rauwe melk bevinden en die zich daarin kunnen vermeerderen.

Bij het bereiden van kaas uit rauwe melk gaat het belangrijkste deel van de melklipase in kaas over. Dit is reeds aangetoond door GOULD (1941). Wij konden dit resultaat met de onderstaande proeven bevestigen.

Aan 2 liter ondermelk werd 180 ml gepasteuriseerde room van een vetgehalte van 39% toegevoegd. Aan 2 liter wei, bereid uit dezelfde melk, voegden wij eveneens 180 ml van bovengenoemde room toe. Beide mengsels werden met behulp van een handhomogenisator gehomogeniseerd bij 30°C, geconserveerd met 5% chloroform en gedurende 7 dagen weggezet bij kamertemperatuur. In tabel 16 is de stijging van het zuurgetal weergegeven. In het eerste geval werd de wei bereid uit centrifugemelk; in het tweede geval uit volle melk.

TABEL 16. *Het gehalte van melklipase in wei*

A	Zuurgetal		B	Zuurgetal	
	direct	na 7 dagen		direct	na 7 dagen
Centrifugemelk en room	0,3	3,6	Centrifugemelk en room	0,3	7,1
Wei en room	0,3	1,0	Wei en room	0,3	2,1

In wei uit „gewone" melk bevindt zich nog een geringe, hoewel aantoonbare hoeveelheid lipase, die blijkbaar bij het stremmen van de melk niet wordt ingesloten, doch het grootste gedeelte van de lipase komt in de kaas terecht.

Het zou kunnen zijn, dat de lipolytische activiteit van de wei veroorzaakt wordt door lipasen van microbiologische oorsprong. Het leek ons daarom juist ook hier een proef te verrichten met „aseptisch" gewonnen melk. Het gehalte aan melklipase in de volle melk en in daaruit bereide wei, werd ook hier bepaald door aan deze vloeistof room toe te voegen, haar te homogeniseren en te conserveren met 5% chloroform. Na 7 dagen werd weer de stijging van het zuurgetal nagegaan (tabel 17).

TABEL 17. *Het gehalte aan melklipase in wei bereid uit „aseptisch" gewonnen melk*
Aantal vetsplitsers melk: 195/ml

	Direct	Melk na 7 dagen	Wei na 7 dagen
Zuurgetal van het vet	0,3	5,3	0,6

Uit de tabel blijkt, dat de wei weinig melklipase bevat en dat bij het stremmingsproces een groot deel van de melklipase in de wrongel overgaat.

Uitgaande van de gedachte, dat melklipase bijna geheel wordt ingesloten, hebben wij kaas bereid uit een mengsel van 50 % gepasteuriseerde melk en 50 % rauwe wei. De wei was gedurende 6 uren bewaard bij lage temperatuur. De vethydrolyse in deze kaas was belangrijk groter dan in de kaas bereid uit de gepasteuriseerde melk zonder toevoeging. Tabel 18 geeft dit aan.

TABEL 18. *Het toevoegen van rauwe wei aan gepasteuriseerde melk en de vetsplitsing in de daaruit bereide kaas*

Duur van de rijping	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit een mengsel van 50% gepasteuriseerde melk en 50% rauwe wei	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	1,4	goede kaas	2,2	goed
10 weken	2,2	geen kaassmaak, iets zuur	3,2	kaassmaak
20 weken	3,2	heel weinig kaassmaak; zuiver	4,8	kaassmaak
30 weken	3,9	weinig kaassmaak	6,1	duidelijke kaassmaak; iets zout

De oorzaak van de grotere vethydrolyse in de kaas bereid met toevoeging van rauwe wei moet ons inziens in verband worden gebracht met lipase afkomstig van in de wei voorkomende vethydrolyserende bacteriën.

Men kan veronderstellen, dat de geringe hoeveelheid melklipase in de toegevoegde wei zich in de kaas ophoopt en aldus de grotere vethydrolyse teweeg brengt. Bij proeven met „aseptische" melk bleek echter, dat de activiteit van melklipase van wei, bereid uit een mengsel van 50 % gepasteuriseerde melk en 50 % rauwe wei, niet lager was dan de helft van de activiteit van de rauwe wei.

Het is interessant in dit verband te vermelden, dat bij een proef waarbij de weiwrongel van gepasteuriseerde melk werd geroerd met rauwe wei, er van een vermeerderde vethydrolyse geen sprake is. Hier, evenals bij de proeven met de kaassuspensie, blijkt, dat slechts het toevoegen vóór het stremmen enige invloed vermag uit te oefenen. Dit versterkt ons vermoeden, dat het bij de vethydrolyse tijdens de kaasrijping meer gaat om de enzymen die van meet aan in kaas worden ingesloten dan om de enzymen die daarin gevormd worden.

e. Het rijpen van kaasmelk

In de praktijk van het kaasmaken is de ervaring opgedaan, dat uit melk die enige tijd is bewaard, dikwijls een beter product bereid kan worden dan uit verse melk. Bij de bereiding van Emmentaler kaas geeft men er zelfs sterk de voorkeur aan kaas te bereiden uit „gerijpte" melk. Ook is waargenomen, dat bij gebruik van scheproom betere kaas kan worden verkregen dan gebruik van centrifugaal verkregen room. Wij hebben getracht hiervoor een verklaring te geven. In de kaasmakerij van het laboratorium werd daartoe een hoeveelheid rauwe melk na goed mengen verdeeld in 2 porties. Eén portie werd direct verkaasd; de andere portie werd enige tijd bewaard en daarna verkaasd. Het resultaat van twee van dergelijke proefnemingen is in tabel 19 vermeld. De melk werd hierbij gedurende 10 en 24 uur bewaard bij 16 °C.

TABEL 19. *Het rijpen van kaasmelk en de vetontleding tijdens de kaasrijping*

Ouderdom van de kaas	Kaas bereid uit verse rauwe melk		Kaas bereid uit dezelfde melk na 10 uur bewaren	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	1,9	goed; iets zuur	2,0	goed
10 weken	3,3	kaassmaak; onzuiver; enige vetzuurlucht	4,3	flinke kaassmaak; onzuiver; vetzuurlucht
20 weken	6,6	kaassmaak; zout; onzuivere nasmaak; vetzuurlucht	7,7	vrij scherpe kaassmaak; zout; sterke vetzuurlucht
	Kaas direct bereid		Kaas bereid na 24 uur bewaren van de melk	
3 weken	1,9	goed; iets zuur; geen vetzuurlucht	3,2	goed; nasmaak goor; vetzuurlucht
10 weken	3,4	enige kaassmaak; enige vetzuurlucht	8,8	scherpe vetzuursmaak; vetzuurbitter
20 weken	6,5	kaassmaak; onaangename bijsmaak; iets zout	13,6	sterke vetzuursmaak; zout; sterke vetzuurlucht

In het voorgaande (blz. 19) bleek, dat het toevoegen van 10 delen rauwe melk aan 90 delen gepasteuriseerde melk de vethydrolyse niet merkbaar verhoogt. Bij deze proeven werd het mengsel onmiddellijk verkaasd. Toen wij een dergelijk mengsel niet direct verkaasden, doch het gedurende enige tijd bewaarden, konden wij wel een verhoogde vethydrolyse aantonen (tabel 20).

TABEL 20. *Kaas bereid uit een mengsel van 90 delen gepasteuriseerde melk en 10 delen rauwe melk*

Ouderdom van de kaas	Kaas direct bereid		Kaas bereid na 23 uren bewaren bij 16 °C van het mengsel	
	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	1,7	goed; zuiver van smaak	2,5	goed; iets bitter
10 weken	1,3	geen kaassmaak; iets zuur	4,7	kaassmaak; niet geheel gelijk aan de rauwe kaas
20 weken	1,6	weinig kaassmaak; goed product	7,1	vrij pikante kaassmaak; minder volle smaak dan rauwe kaas; flinke vetzuurlucht
30 weken	1,8	weinig kaassmaak; goede fabriekskaas	9,1	pikante rauwe kaas; iets bitter; sterke vetzuurlucht

De proefnemingen waarvan de resultaten in tabel 19 en 20 zijn vermeld, maken het waarschijnlijk, dat er tijdens het bewaren van melk lipase gevormd kan worden en dat deze in kaas werkzaam is. Bij het zoeken naar een verklaring zijn wij van de veronderstelling uitgegaan, dat de aërobe vethydrolyserende micro-organismen hierbij van belang zijn.

f. Tengevolge van een toevoeging van aërobe vethydrolyserende micro-organismen kan de vethydrolyse in kaas toenemen

Onze opvatting, dat het de aërobe vethydrolyserende micro-organismen zijn, die in kaas een enzym kunnen achterlaten, wordt versterkt door de waarneming, dat deze micro-organismen, in reinculture toegevoegd aan de kaasmelk, in kaas vethydrolyse kunnen veroorzaken. Omdat deze micro-organismen in kaas snel sterven, zal het aantal, in de melk aanwezig direct vóór het kaasmaken, de mate van vetsplitsing bepalen.

Tabel 21A bevat de cijfers van de vetafbraak van kaas bereid uit melk, waaraan stijgende hoeveelheden van een culture van een *Alcaligenes viscosus* stam (23a) waren toegevoegd. Deze stam werd geïsoleerd uit rauwe melk.

In dezelfde tabel is opgenomen, hoe het vet werd afgebroken in kaas, bereid uit melk waaraan micrococcen, geïsoleerd uit rauwe kaas, toegevoegd waren. Deze micrococcen worden meestal in rauwe kaas gevonden. Wij komen hierop in een volgend hoofdstuk nog terug (blz. 35). Aan de melk werd in het geval vermeld onder A 4 uur voor het verkazen 0,6% zuursel toegevoegd om groei der toegevoegde bacteriën te belemmeren.

TABEL 21. *De invloed van enige reincultures op de vetontleding in kaas*

A	1) niet geënt		2) Geënt met 7 ml van een 4 dagen oude culture van *Alcaligenes viscosus* (23a) in ondermelk		3) Idem geënt met 14 ml		4) Idem geënt met 21 ml	
	Aantal vethydrolyserende bacteriën: 425		Aantal vethydrolyserende bacteriën: 294000		Aantal vethydrolyserende bacteriën: 582000		Aantal vethydrolyserende bacteriën: 880000	
Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
10 weken	1,7	geen kaassmaak; bitter	3,3	kaassmaak; iets bitter	4,2	meer kaassmaak dan kaas onder 2)	5,3	kaassmaak
25 weken	2,6	geen kaassmaak; iets bitter	5,9	kaassmaak; iets bitter; iets zout	8,1	goede kaassmaak; minder kaassmaak dan onder 4); iets zout	9,6	flinke kaassmaak; zuiver van smaak
B	1) niet geënt		2) Toegevoegd een culture van micrococcen (XIVa)		3) Toegevoegd een culture van micrococcen (XIVb)			
	Aantal vethydrolyserende bacteriën: 0		Aantal vethydrolyserende bacteriën: 680000		Aantal vethydrolyserende bacteriën: 300000			
3 weken	0,8	goed	0,7	goed; iets zuur	0,7	geen kaassmaak		
10 weken	0,9	geen kaassmaak; iets bitter	1,0	geen kaassmaak; iets zuur	1,1	geen kaassmaak; bitter		
20 weken	1,7	geen kaassmaak; iets bitter	1,4	geen kaassmaak; iets bitter	1,4	geen kaassmaak; bitter		
30 weken	2,6	geen kaassmaak; iets zout	3,8	weinig kaassmaak; iets bitter	2,2	geen kaassmaak; bitter; iets zout		

Bij de kaas, genoemd in het eerste deel van de tabel is een sterke vethydrolyse opgetreden, maar dat was niet het geval in de tabel onder B, althans niet in sterke mate. Deze voorbeelden illustreren duidelijk, dat bij de vethydrolyse in kaas de micro-organismen van melk van meer invloed kunnen zijn dan die van kaas. Het is in dit verband belangrijk te vermelden, dat HANSEN reeds in 1937 waarnam, dat bepaalde soorten van het genus *Pseudomonas* en *Achromobacter* in staat waren het vet in kaas af te breken. Merkwaardigerwijze heeft men dit nooit in verband gebracht met een besmetting van de rauwe melk met deze soorten en de vethydrolyse tijdens de rijping van kaas.

4. DE INVLOED VAN DE KORSTFLORA

a. De afbraak van vet geschiedt in de rand van de kaas sneller dan in het inwendige

Bij de bespreking over de invloed van het model en het gewicht van de kaas op de vethydrolyse tijdens de rijping (blz. 6) bleek, dat in de kleinste kaas het vet het snelste werd afgebroken. Uit talrijke waarnemingen bleek bovendien, dat het vet in de rand van een kaas een hoger zuurgetal heeft dan het vet in het inwendige. Dit verschil wordt groter naarmate de kaas langer wordt bewaard. Hiermede kan de invloed van het model en het gewicht verklaard worden. Immers, bij kleine kazen is het oppervlak ten opzichte van de kaasmassa groter dan bij grote kazen.

Tabel 22 heeft betrekking op een voorbeeld. Zij toont in welke mate het vet van een grote Goudse kaas in de rand en in het midden wordt afgebroken.

TABEL 22. *Het zuurgetal van het vet in de rand en in het midden van de kaas*

Duur van de rijping	Zuurgetal in de rand (laagdikte 10 mm)	Zuurgetal in het midden
20 weken	8,3	4,3
30 weken	18,3	7,2

Men zou kunnen veronderstellen, dat dit verschijnsel wordt veroorzaakt door de omstandigheden waarbij de proefkazen werden bereid en bewaard. Daarom is nagegaan, of het zich ook in de praktijk voordoet. Kazen uit verschillende delen van het land afkomstig en op verschillende wijzen bereid werden geanalyseerd. Zonder één uitzondering had het vet uit de kaaskorst een hoger zuurgetal dan het vet uit het inwendige van de kaas.

b. Een verklaring van de snelle vethydrolyse in het randgedeelte van kaas

Voor het geven van een antwoord op de vraag, waarom het zuurgetal in de rand van kaas hoger is dan in het midden, is het logisch te denken aan vethydrolyserende micro-organismen, die op het oppervlak groeien. Om na te gaan of hier inderdaad van een invloed van de microflora sprake is werd getracht deze uit te schakelen. Hiertoe werd de helft van een aantal kazen na het pekelen voortdurend bestraald met ultraviolet licht. (T.U.V.-lamp, Philips, 1953). De andere kazen werden onder normale omstandigheden bewaard. Ofschoon op deze wijze het verschil in zuurgetal tussen rand en midden belangrijk kon worden gereduceerd, kon toch het verschil niet worden opgeheven. Nu is het bekend, dat een behandeling met kiemdodende ultraviolette stralen niet voldoende is om in korte tijd alle kiemen op het oppervlak te doden (SCHULZ, 1953). Het

gelukte echter de oppervlakteflora uit te schakelen door de kazen om de 2 dagen met een oplossing van sublimaat in alcohol (2‰ sublimaat in alcohol 70 %) te behandelen. In tabel 23 is weergegeven, hoe het zuurgetal gedurende de rijping in het rand- en middengedeelte verandert bij een bereiding van kaas uit rauwe melk resp. uit gepasteuriseerde melk (20 min. op 72 °C). Ten overvloede werd de kaas gedurende het gehele rijpingsproces bestraald met kiemdodende ultraviolette stralen.

TABEL 23. *Invloed van de korstflora op de vetsplitsing. De invloed van een behandeling met een 2‰ oplossing van sublimaat en een bestraling met ultraviolet licht bij kaas bereid uit rauwe en gepasteuriseerde melk*

	Zuurgetal in de rand (laagdikte 5 mm)	Zuurgetal in het midden
Kaas bereid uit rauwe melk:		
1. behandeld met 2‰ oplossing van sublimaat en bestraald met ultraviolet licht; rijping na:		
3 weken	3,0	1,7
10 weken	5,2	3,3
20 weken	13,9	5,1
2. normaal bewaard; rijping na:		
3 weken	11,0	1,6
10 weken	32,7	3,4
20 weken	39,0	4,9
Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk:		
1. behandeld met een oplossing van 2‰ sublimaat en ultraviolet licht; rijping na:		
2 weken	0,7	0,6
22 weken	0,7	0,7
31 weken	0,8	0,7
2. normaal bewaard; rijping na:		
2 weken	5,9	1,0
22 weken	27,0	0,9
31 weken	29,9	1,0

In de tabel is te zien, dat het verschil in vetsplitsing tussen rand- en middengedeelte bij genoemde behandeling verdwijnt, indien de melk zodanig wordt gepasteuriseerd, dat in het inwendige van de kaas geen stijging van enige betekenis optreedt en dus de lipasen in de melk zijn vernietigd. Wanneer de kaas bereid wordt uit rauwe melk, dan is genoemde behandeling wel in staat het verschil tussen het rand- en middengedeelte zeer belangrijk te reduceren maar het zuurgetal in de rand blijft hoger dan in het midden. Dit doet vermoeden, dat er behalve de microflora van het oppervlak nog een tweede oorzaak moet zijn. Deze tweede oorzaak werd nog niet opgespoord. Bij proefnemingen van oriënterende aard bleek telkens weer, dat de vetsplitsing in de korst groter was als de kaas een droog (uitgedroogd) oppervlak had dan wanneer het uitdrogen van de korst werd tegengegaan. De resultaten van de proef waarop tabel 24 betrekking heeft, illustreren dit duidelijk. Bij deze proef werd een Edammer kaas door midden gesneden. De ene helft werd bewaard in een exsiccator met een relatieve

luchtvochtigheid van 99%, de andere helft in een exsiccator met een relatieve luchtvochtigheid van 70%. Het gehele oppervlak van de twee helften werd nu behandeld met een 2‰ sublimaatoplossing op gelijke wijze als hierboven is vermeld. Na enige tijd werden zuurgetallen bepaald van het kaasvet van het snijvlak en van het daaronder gelegen gedeelte. Tabel 24 bevat de resultaten.

TABEL 24. *De invloed van het bewaren van doorgesneden kaas bij verschillende luchtvochtigheden onder steriele omstandigheden*

Vochtigheid van de lucht	Ouderdom van de kaas	Zuurgetal van het vet (1 cm snijvlak)	Zuurgetal van het vet van het „midden"
99% rel. vochtigheid	14 weken	3,1	3,1
	20 weken	5,1	4,2
70% rel. vochtigheid	14 weken	3,1	3,1
	20 weken	7,3	5,8

Uit de gegevens in de tabel volgt, dat een „nieuw snijvlak" na enige tijd ook een hoger zuurgetal bezit dan „het inwendige" van de kaas. Bij het bewaren bij een lage relatieve vochtigheid stijgt het zuurgetal tot hogere waarden dan bij het bewaren bij een hoge relatieve vochtigheid. Of er mogelijk een oorzakelijk verband bestaat tussen een droge omgeving of het uitdrogen van het kaasoppervlak en de versnelde vetsplitsing in dat oppervlak, kan nog niet worden gezegd.

HOOFDSTUK IV

DE MICROBIOLOGIE VAN DE VETSPLITSING BIJ DE KAASRIJPING

1. INLEIDING

In hoofdstuk III werd er bij de bespreking van lipasen van microbiologische oorsprong op gewezen, dat bij de bereiding van kaas de groeimogelijkheden voor de micro-organismen sterk veranderen.

In verse melk heersen aërobe omstandigheden. De pH van melk is gunstig voor de ontwikkeling van micro-organismen. Melk is rijk aan tal van belangrijke voedingsstoffen. De zoutconcentratie en de osmotische druk zijn laag. Deze omstandigheden maken melk tot een zeer gunstig milieu voor de groei van allerlei micro-organismen. De soortenrijkdom van de microflora van rauwe melk is dan ook zeer groot.

In kaas is de toestand geheel anders. In het inwendige van de kaas zijn de redoxpotentiaal en de pH laag en is melksuiker na afloop van de melkzuurgisting niet meer aanwezig; bovendien bevat kaas veel keukenzout. Dit alles maakt, dat kaas duurzaam kan zijn.

Het oppervlak van kaas heeft vanzelfsprekend een hoge redoxpotentiaal. Ook hier is na enige tijd geen suiker meer aanwezig en is de pH laag. In het begin van het rijpingsproces bevat het medium meer zout dan het inwendige van de kaas, maar de aanwezigheid van lucht maakt de flora toch rijker dan dat in het inwendige het geval is.

In bacteriologische zin kunnen dus 3 media worden onderscheiden: de melk, het inwendige van de kaas en het oppervlak van de kaas.

De rijping zal afhangen van de ontwikkelingsmogelijkheden van de aanwezige micro-organismen. Deze mogelijkheden worden bepaald door de samenstelling en de toestand van de media, die op hun beurt weer worden bepaald door de behandeling en de bewaring van de melk, de bereidingsmethode en de omstandigheden waarbij de kaas wordt bewaard.

Bij melk zal het belangrijk zijn, of bij en na het winnen hiervan de besmetting sterk is, of na het winnen groei van micro-organismen kan optreden en of de melk rauw of gepasteuriseerd wordt verwerkt. Bovendien kan een nieuwe besmetting na de pasteurisatie van belang zijn.

Eigenschappen van kaas zoals het vochtgehalte, de pH en het zoutgehalte zullen in belangrijke mate de groeimogelijkheden der micro-organismen in de kaas bepalen. Behalve de genoemde factoren zullen ook de temperatuur en vooral de vochtigheid van de lucht, waarbij de kaas bewaard wordt, een grote invloed uitoefenen op de korstflora.

Achtereenvolgens zal worden besproken, welke geslachten, eventueel welke soorten micro-organismen, in de drie bovengenoemde media te vinden zijn of gewoonlijk gevonden worden. Daarna zal worden behandeld, wat hun invloed is op de vetontleding bij de kaasrijping. Vanwege de uitgebreidheid van deze materie zijn wij genoodzaakt ons tot de hoofdzaken te beperken.

a. De microflora van „aseptisch" gewonnen melk

Aangezien bij de hierboven beschreven proefnemingen vaak gebruik is gemaakt van „aseptisch" gewonnen melk, zal de microflora van deze melk aan een afzonderlijke beschouwing worden onderworpen.

Het is reeds lang bekend, dat de melk bij het verlaten van de uier van de koe niet steriel is. Vele onderzoekers hebben zich met de studie van de microflora van deze melk bezig gehouden. (EVANS, 1916; STECK, 1921 en 1930; BREED, 1928; DORNER, 1930 en GRABER, 1954). De drie voornaamste groepen, waaruit deze flora bestaat, zijn de streptococcen van de pyogenesgroep, de micrococcen (staphylococcen) en de corynebacteriën. Een enkele maal zullen in „aseptisch" gewonnen melk van sommige dieren ook tuberkel-bacteriën, *Brucella*-organismen en colibacteriën (THOMAS, 1955) gevonden worden. Deze veelal pathogene bacteriën zullen niet in de volgende beschouwing worden betrokken. Indien *Streptococcus lactis* in „aseptisch" gewonnen melk wordt gevonden, zal een dergelijke besmetting vaak als een na-infectie moeten worden beschouwd. LEITCH (1934) kon echter *Str. lactis* var. *maltigenes* in „aseptisch" gewonnen melk aantonen. De door ons gewonnen melk werd zelfs na enige dagen bewaren bij kamertemperatuur niet zuur, hetgeen niet het geval zou zijn geweest bij het voorkomen van *Streptococcus lactis*.

b. De in rauwe melk voorkomende micro-organismen

De infecties, die er plaats vinden nadat de melk de uier van de koe heeft verlaten zullen sterk afhankelijk zijn van de wijze van winnen.

In vele gevallen zal een infectie van de huid van de koe en van de handen van de melker afkomstig zijn. GALESLOOT (1954) is van mening, dat wij hierdoor een verhoging krijgen van het aantal micrococcen en corynebacteriën. Meestal zullen ook de enterococcen en enterobacteriën hierbij in de melk terecht komen.

(*Str. faecalis*, *Str. liquefaciens* en de coli-aërogenesbacteriën). Daarnaast kan hier een besmetting plaats vinden met *Betacoccus bovis* en *Str. durans*.

Het stof dat in de melk valt, bevat waarschijnlijk veel aërobe en anaërobe sporevormers, schimmels, gisten en enige vertegenwoordigers van bovengenoemde groepen. Ook uit de lucht wordt de melk geïnfecteerd met schimmels, gisten, aërobe sporevormers en bovendien met niet-sporogene staafvormige bacteriën (THOMÉ, 1942). Meestal is deze besmetting gering.

Een veel belangrijkere infectiebron is het melkmateriaal. Het merendeel van de bacteriën die in de melk terecht komen, is hiervan afkomstig. (BRINCKMAN, 1953). Veel zal hier natuurlijk afhangen van de wijze, waarop dit melkmateriaal wordt gereinigd. De micro-organismen die hierbij in de melk terecht komen, behoren tot de geslachten *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* en *Flavobacterium*. Ook kunnen nu in de melk belanden de melkzuurbacteriën zoals *Str. lactis* en *Str. cremoris*, de coli-aërogenes bacteriën en de thermoresistente micrococcen en microbacteriën.

Dat de besmetting van de melk vooral afkomstig is van het melkmateriaal, illustreren de cijfers vermeld in tabel 25. De proeven waarop de tabel betrekking heeft, werden genomen op de boerderij van de Landbouwhogeschool, afdeling Veeteelt. Het aantal vetsplitsers werd op de gewone wijze bepaald met behulp van een voedingsbodem van de volgende samenstelling: 1% trypton, 1% tributyrine, 2% agar; de voedingsbodem werd met melkzuur op pH 5,7 gebracht.

TABEL 25. *De invloed van de wijze van winnen van de melk op het aantal vethydrolyserende bacteriën*

Datum	Behandeling van de uier van de koe enz.	Melkmateriaal	Aantal vetsplitsers	Hoofdflora
1) 19-5-'52	uier met zeep gewassen; handen van de melker met zeep gewassen	steriel stopflesje	10	*Micrococci* (*Staphylococci*)
	uier niet behandeld	melkmateriaal van de boerderij niet speciaal gereinigd of gedesinfecteerd	78000	*Achromobacteriaceae* *Micrococci* (*Staphylococci*)
2) 26-5-'52	uier met zeep gewassen; handen van de melker met zeep gewassen	steriel stopflesje	330	*Micrococci* (*Staphylococci*) *Corynebacteria*
	uier niet behandeld	steriel stopflesje	12600	*Micrococci* en *Corynebacteria*
	uier niet behandeld	melkmateriaal van de boerderij niet speciaal gereinigd of gedesinfecteerd	1120000	*Achromobacteriaceae* *Pseudomonas-soorten* *Micrococci*
3) 28-5-'52	uier niet behandeld	steriel stopflesje	4800	*Micrococci* en *Corynebacteria*
	uier niet behandeld	melkmateriaal van de boerderij niet speciaal gereinigd of gedesinfecteerd	140000	*Achromobacteriaceae* *Pseudomonas-soorten* *Rhodotorula*

c. *De microflora van gepasteuriseerde melk*

De microflora van gepasteuriseerde melk is in de laatste tijd uitvoerig bestudeerd. In Nederland gebeurde dit door GALESLOOT (1951, 1952 en 1953).

Tot de thermoresistente bacteriën van gepasteuriseerde melk rekent men vertegenwoordigers der micrococcen, der microbacteriën, der streptococcen en der sporevormers. Ook wordt in gepasteuriseerde melk *Achromobacter tolerans* gevonden (Abd-el MALEK en GIBSON, 1952).

Behalve deze thermoresistente flora kan gepasteuriseerde melk tengevolge van na-infectie nog allerlei andere soorten micro-organismen bevatten. Dit zijn vooral niet-thermoresistente achromobacteriën, niet-thermoresistente streptococcen en vertegenwoordigers van de geslachten *Pseudomonas*, *Flavobacterium* en van de coli-aërogenesbacteriën. Het zal van de wijze van bewaren afhangen, of bij een eventuele na-infectie een snelle groei van de niet-thermoresistente bacteriën kan plaats vinden.

d. De microflora van het inwendige van de kaas

Zoals op blz. 17 reeds is gebleken vindt in zeer jonge kaas een belangrijke afneming van het aantal vethydrolyserende bacteriën plaats (aantal bepaald op: trypton 1%, tributyrine 1%, 2% agar, pH 5,7). Hieronder is nogmaals een voorbeeld vermeld van de afneming van het aantal van deze vethydrolyserende bacteriën (fig. 4).

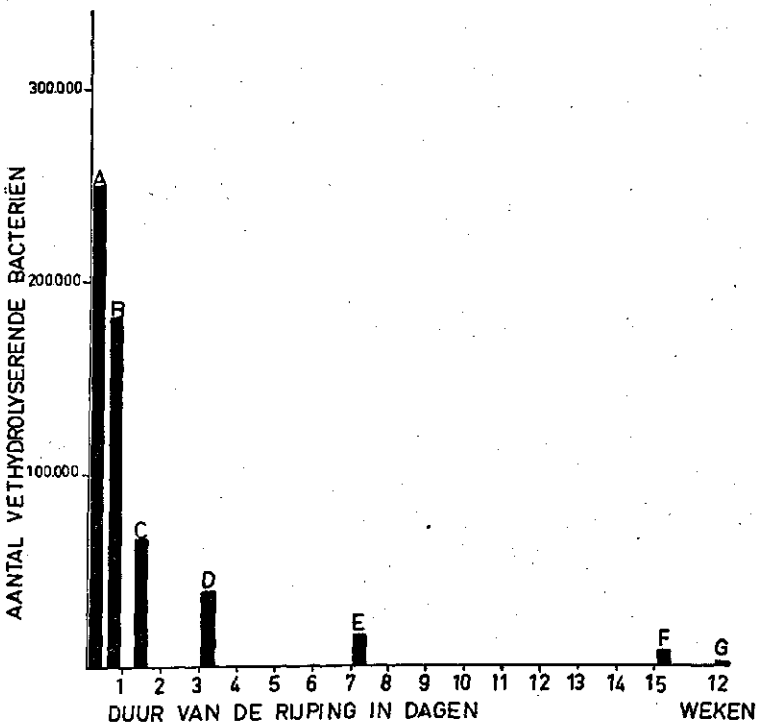

FIG. 4. Aantal vethydrolyserende bacteriën in:

A	1 ml melk	E	0,1 g kaas na 7 dagen
B	0,1 g kaas na het persen	F	0,1 g kaas na 15 dagen
C	0,1 g kaas na het omlopen	G	0,1 g kaas na 12 weken
D	0,1 g kaas na 3 dagen		

Het is van belang de oorzaken te kennen, waardoor deze afneming veroorzaakt wordt. De volgende mogelijkheden komen in aanmerking:

1. De lage pH, veroorzaakt door de omzetting van lactose in melkzuur.
2. De lage redoxpotentiaal.
3. Een eventuele afscheiding van antibiotica door b.v. melkzuurbacteriën.

Ofschoon hierover verscheidene proeven werden verricht zij hier volstaan met slechts één proef in het kort te bespreken teneinde de invloed van genoemde factoren te demonstreren.

Er werden vier kolfjes met 25 ml steriele ondermelk geënt met een oogje van een suspensie van een reinculture van *Alcaligenes viscosus*. Aan één van de kolfjes was vóór het steriliseren een beetje krijt toegevoegd. Nadat zij 16 uur bij 25 °C hadden gestaan, werd één van de kolfjes met melkzuur op pH 5,0 gebracht. Aan een tweede kolfje werd niets toegevoegd. Beide kolfjes werden weggezet bij 25 °C onder waterstof in een exsiccator. Een derde kolfje, waaraan krijt was toegevoegd, werd na 16 uur bebroeden geënt met een cultuur van *Str. lactis*. Tenslotte werd dit kolfje tezamen met het vierde kolfje weggezet bij 25 °C. Na 3 dagen werd van de melk in de vier kolfjes het aantal vethydrolyserende bacteriën en de pH bepaald. Tabel 26 bevat de resultaten.

TABEL 26. *De invloed van de afwezigheid van zuurstof, van de lage pH en van de groei van Str. lactis op de vermindering van het aantal levende kiemen in een culture van Alcaligenes viscosus*

Beginaantal	Aantal na 3 dagen			
	Aëroob pH 6,85	Anaëroob pH 6,65	Anaëroob; met melkzuur aangezuurd tot pH 5,04	Door melkzuurbacteriën verzuurd tot pH 5,03
7000000	620000000	10800000	3500	360000

Duidelijk is te zien, hoe groot de invloed van de lage redoxpotentiaal en van de lage pH is. Dat het kiemgetal in de melk geënt met zuursel hoger is dan in de met melkzuur aangezuurde melk, vindt waarschijnlijk zijn oorzaak hierin, dat het in het eerste geval langer duurde voor de lage pH bereikt werd en er langer een mogelijkheid tot groei was.

Behalve een sterke vermindering van het aantal organismen die goede groeimogelijkheden op de door ons gebruikte voedingsbodem bezitten, zal er in het begin van het kaasbereidingsproces een sterke groei van *Str. lactis* en *Str. cremoris* optreden. Daarnaast zal ook een groei van betacoccen kunnen plaatsvinden. Later treden voor de streptococcen streptobacteriën en wel *Streptobacterium plantarum* en *Streptobacterium caseï* in de plaats. PETTE noemde verder nog de enterococcen (*Str. faecalis* en *Str. liquefaciens*, PETTE, 1947). Ook komen in kaas betabacteriën voor. Behalve deze vertegenwoordigers van de melkzuurbacteriën worden in kaas vaak micrococcen gevonden. Op de betekenis van deze micrococcen zullen wij nog uitvoerig terugkomen.

e. De microflora van het oppervlak van de kaas

Bij vele kaassoorten is reeds een uitvoerige studie gemaakt van de oppervlakteflora b.v. voor Limburgse kaas door KELLY en MARGUARDT (1939), voor Brick kaas door LANGHUS e.a., voor Tilsiter kaas door WOLFF (1909), DREWES (1937) en DOMMEN (1954). Voor de harde Nederlandse kaassoorten is echter nooit uitvoerig bestudeerd, of er van een invloed van de korstflora bij het rijpingsproces sprake is en het is een open vraag, of het wel wenselijk is deze flora met alle mogelijke middelen te bestrijden, zoals men in het algemeen meent te moeten doen.

Wij hebben bij een aantal kazen nagegaan, hoe bij de wijze van behandelen en bewaren zoals die in het laboratorium gebruikelijk was, het aantal gisten en schimmels en het aantal dat groeide op de trypton-tributyrine-agar voedingsbodem, veranderde tijdens de rijping. Tabel 27 bevat de resultaten. In figuur 5 zijn deze aantallen uitgezet tegen de tijd.

Het aantal gisten en het aantal op trypton-tributyrine-agar groeiende kiemen is hierbij resp. door 100 en 200 gedeeld. De gisten werden bepaald met behulp van zure moutagar (pH 4,0). De trypton-tributyrine-agar bestond uit: 1% trypton, 1% tributyrine en 2% agar. De pH van de voedingsbodem werd ingesteld op 5,7.

Voor het verkrijgen van een monster werd met een steriel mes een dun schijfje van 1 cm^2 uit het oppervlak gesneden; dit werd aangevuld tot het gewicht van 1 g met kaas uit het inwendige van hetzelfde product. Na wrijven in een steriele mortier met 8 ml steriel water en 1 ml van een steriele Na-citraatoplossing werden van de verkregen oplossing op de gebruikelijke wijze verdunningen gemaakt (DORNER, 1943). Het aantal in één ml van de genoemde oplossing werd opgegeven als het aantal per 0,1 cm^2.

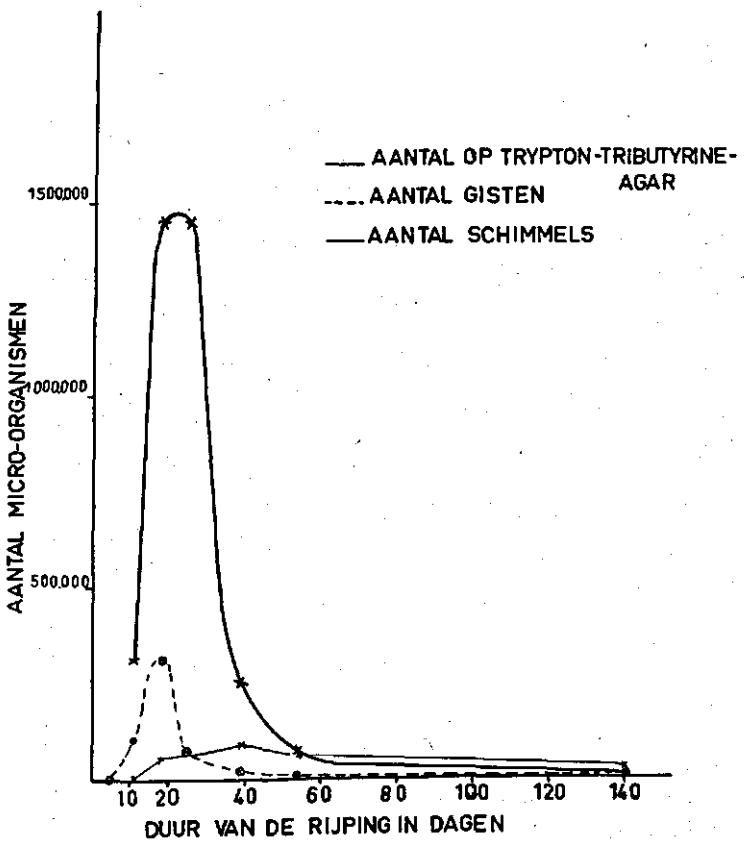

FIG. 5. Veranderingen in het aantal micro-organismen van het oppervlak van kaas tijdens de rijping

TABEL 27. *Veranderingen in het aantal micro-organismen van het oppervlak van kaas tijdens de rijping*

Duur van de rijping	Schimmels	Gisten	Aantal op trypton-tributyrine-agar
4 dagen	1000	1000	niet bepaald
11 dagen	8000	9100000	61000000
18 dagen	57000	31900000	290000000
25 dagen	66000	7600000	288000000
39 dagen	90000	2210000	52000000
54 dagen	68000	1230000	14900000
140 dagen	27000	1180000	1850000

Op het oppervlak van kaas worden aanvankelijk vaak gisten gevonden. Deze soorten behoren voornamelijk tot de geslachten *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Candida* en *Torulopsis*. Deze gisten worden opgevolgd door of samen gevonden met staafvormige obligaat aërobe maar ook niet-obligaat aërobe organismen behorend resp. tot de geslachten *Bacterium* en *Corynebacterium*. Naast micrococcen treedt er groei van schimmels op meestal behorend tot de geslachten *Oöspora*, *Aspergillus*, *Penicillium* en *Mucor*.

2. METHODEN

Achtereenvolgens zal de invloed van de verschillende genera worden besproken in verband met de vetsplitsing bij de kaasrijping.

Deze vetsplitsing werd bij de belangrijkste der genoemde micro-organismen op de volgende wijze bepaald:

a. De stam werd geënt in steriele room (15% vet). Direct en na een incubatie van 14 dagen bij 16°C werd het zuurgetal van het roomvet bepaald. Het vet werd door karnen van de room en door smelten en centrifugeren van de boter verkregen. Werd bij deze bepaling een negatief resultaat verkregen, dan werd de desbetreffende stam geacht geen botervet-splitsend vermogen te bezitten. Bij een positief resultaat pasten wij bovendien één van de volgende methoden toe:

b. In room (15% vet) werd een overmaat $CaCO_3$ gebracht, zodat de pH hiervan na steriliseren en na enten met zuursel na 2 dagen een waarde had bereikt van 5,0. Hierna werd de te bestuderen stam geënt in deze room. Na 1 dag bebroeden bij kamertemperatuur werd zoveel van een steriele zoutoplossing toegevoegd, dat de concentratie van het zout in het serum 5% bedroeg. Na een incubatietijd van 4 weken bij 16°C werd de stijging van het zuurgetal nagegaan.

Zoals hierna zal worden vermeld hebben wij bij de *Pseudomonas*-soorten de *Achromobacteriaceae* en *Serrateae* een enigszins gewijzigde proef toegepast.

c. Ook werden cultures van sommige stammen in melk, toegevoegd aan gepasteuriseerde melk. Bij de uit deze melk bereide kaas werd nagegaan, of er een extra stijging in het zuurgetal van het kaasvet optrad.

3. UITKOMSTEN

a. De invloed der micrococcen

In melk maar ook in en op kaas komen een belangrijk aantal grampositieve, aërobe en facultatief anaërobe, katalase-positieve coccen voor, die zich op de voedingsbodem bestaande uit trypton-tributyrine-agar vaak voordoen als echte tributyrine aantasters. Het leek ons van belang na te gaan, of deze flora van in-

vloed was bij de vetontleding tijdens de kaasrijping. Deze veronderstelling is door sommige auteurs uitdrukkelijk naar voren gebracht (ALFORD en FRAZIER, 1950).

Er zijn vele pogingen gedaan om deze groep van micro-organismen te determineren (BERGEY'S MANUAL, 1948; HUCKER, 1943; ABD-EL-MALEK en GIBSON, 1948; COWAN en SHAW, 1949). Bij het determineren van een 100-tal coccen geïsoleerd van zowel „aseptisch" als normaal gewonnen melk, van het inwendige en van het oppervlak van kaas hebben wij de wijze van determineren gevolgd, die aangegeven is door SHAW, STITT en COWAN (1951). In tabel 28 geven wij een overzicht van de eigenschappen waarmede genoemde onderzoekers de indeling vastlegden en bovendien een aantal physiologische kenmerken, die naar onze mening in dit verband van belang waren, inclusief het vetsplitsend vermogen. Daarnaast wordt in de tabel de plaats van herkomst genoemd. Bij het bepalen van de physiologische eigenschappen van bacteriën hebben wij bij deze en de hierna te beschrijven organismen zoveel mogelijk de richtlijnen gevolgd aangegeven in het Manual of methods for pure culture study of Bacteria (1950–'53). Indien deze eigenschappen niet in dit manual vermeld stonden of indien een andere bepalingswijze is gevolgd, is dit uitdrukkelijk vermeld aan het begin van de tabel.

Van de door ons geïsoleerde coccen behoorden er

6	tot de	soort	*Staphylococcus*	*aureus, Rosenbach*
30	„	„	„	„	*saprophyticus*
70	„	„	„	„	*lactis*
3	„	„	„	„	*roseus*
2	„	„	„	„	*afermentans*

Zie tabel 28.

Door SHAW, STITT en COWAN (1951) wordt de naam *Micrococcus* niet meer gebezigd. Gezien het grote aantal coccen dat, geïsoleerd van melk, behoort tot de soort *Staphylococcus lactis*, lijkt ons deze soortnaam gelukkig gekozen. Vertegenwoordigers behorend tot het geslacht *Aërococcus* werden niet gevonden

TABEL 28. *Eigenschappen en herkomst der staphylococcen (micrococcen)*

1) Enige methoden die werden gebruikt bij het bestuderen van physiologische eigenschappen der staphylococcen (micrococcen).

Coagulaseproef volgens aanwijzingen der Rijksseruminrichting te Rotterdam.
Men maakt een geconcentreerde suspensie van jonge staphylococcen afgenomen van serum-agar. Hiermede wordt een kleine hoeveelheid runderplasma gemengd. Ontstaat er direct een samenklontering dan is de stam positief.

Haemolyse. Voedingsbodem:
2,3% nutriënt-agar, 4,0% bloed, 0,6% NaCl
Enten en beoordelen op α en β-haemolyse na 7 dagen bij 25°C.

NH_4 als N-bron. Er is gebruik gemaakt van de methode aangegeven door HUCKER (1924).

Groei bij 8°C en 37°C. Voedingsbodem:
2% agar, 1% trypton, 1% tributyrine, 0,1% melk; pH 5,7.
Beoordeling na 7 dagen bij 8°C resp. 37°C.

Thermoresistentie. Gevolgd werd de methode aangegeven door GALESLOOT (1951).

Groei bij pH 5,0 en 5% NaCl. Voedingsbodem:
1% trypton, 2% agar, 0,1% melk, 5% NaCl; pH 5,0.
Beoordeling na 2 en 4 weken aëroob resp. anaëroob staan bij 15 à 16°C.

2). Overzicht van de eigenschappen der staphylococcen (micrococcen).

	Naam van de soort				
	Staphylococcus aureus, Rosenbach	*Staphylococcus saprophyticus*	*Staphylococcus lactis*	*Staphylococcus roseus*	*Staphylococcus afermentans*
aantal	6	30	70	3	2
coagulaseproef	6	0	0	0	0
kleur: rose	0	0	0	3	0
goud	0	1	4	0	0
geel	3	1	41	0	0
wit of kleurloos	3	28	25	0	2
zuur uit glucose	6	30	70	3	0
V.P. proef	2	30	0	0	0
groei in lakmoesmelk: zuur	4	21	40	0	0
alcalisch	1	4	7	2	0
eiwitaantasting	2	13	38	2	0
reductie	3	10	29	1	1
gelatinevervloeiing	4	18	47	1	0
haemolyse-α	0	1	3	0	0
haemolyse-β	2	3	0	0	0
nitraatreductie	5	18	51	0	0
NH_4 als N-bron	3	0	22	0	1
groei bij: 8 °C	1	3	31	3	1
37 °C	6	22	65	3	2
thermoresistentie	3	1	34	0	0
groei bij pH 5 en 5% NaCl: aëroob	4	22	50	3	2
anaëroob	1	3	11	0	0
O_2 obligaat aëroob	4	12	32	2	1
niet-obligaat aëroob	2	15	36	1	1
facultatief anaëroob	0	3	2	0	0
vetsplitsing:					
1. tributyrine	5	21	58	2	2
2. room (begin-pH 6,8) stijging van het zuurgetal: 0–0,1	3	26	67	3	2
0,1–1,0	3	2	1	0	0
1,0–10,0	0	2	2	0	0

3). Plaats van herkomst der onderzochte staphylococcen (micrococcen).

Plaats van herkomst:					
rauwe melk	1	2	23	0	1
gepasteuriseerde melk	0	2	1	0	0
„aseptisch" gewonnen melk	2	2	8	0	0
inwendig „rauwe" kaas	0	6	23	0	1
inwendig „gepasteuriseerde" kaas	0	0	0	0	0
inwendig kaas uit „aseptisch" gewonnen melk	0	3	2	0	0
oppervlakte kaas	2	9	12	3	0
menselijke herkomst	1	3	0	0	0
pekel	0	3	1	0	0

(WILLIAMS, HIRCH en COWAN, 1953). Alle stammen waren grampositief, katalase-positief en meestal aëroob. Sommige coagulase-positieve stammen waren thermoresistent. Het is vooral daarom, dat wij ook dit determinatie systeem niet in alle opzichten kunnen bewonderen. Uit tabel 28 blijkt, dat de groeimogelijk-

heden voor deze bacteriën in kaas gering zijn. Het grootste gedeelte van de stammen is immers niet in staat om onder anaërobe voorwaarden te groeien op een voedingsbodem met 5% NaCl en pH 5. Bij proeven over de vetsplitsing bleek, dat vele micrococcen in staat zijn tributyrine te hydrolyseren. Wanneer zij echter in steriele room werden geënt, bleken na 14 dagen bij 15°C slechts 2 van de door ons uit melk en kaas geïsoleerde niet-pathogene stammen (indices 19 a en 22 m) een sterke vethydrolyse te vertonen; 3 stammen (indices 29 f, 32 e en 32 b) vertoonden een nog meetbare stijging van het zuurgetal van het botervet. Nu is het enten van een bacteriestam in room een zeer gevoelige proef om na te gaan, of deze in staat is botervet te hydrolyseren. Bij het optreden van een positief resultaat is het nog niet zeker, dat de bedoelde organismen ook in staat zijn in kaas vethydrolyse te veroorzaken. Wij hebben daarom één week oude cultures in ondermelk van de positieve stammen geënt in gepasteuriseerde melk en van de daaruit bereide kaas nagegaan of er een stijging van het zuurgetal optrad. De stammen die een geringe vethydrolyse in room te zien gaven, werden tesamen in een portie kaasmelk gebracht. Tabel 29 bevat de resultaten.

TABEL 29. *De invloed van enige botervethydrolyserende micrococcen op de vetontleding in kaas*

Duur van de rijping	Zuurgetal van het kaasvet			
	Geen toevoeging	0,03% van een culture van 19a	0,03% van een culture van 22m	0,03% van een culture van 29f, 32e en 33b
3 weken	0,5	0,5	0,5	0,5
8 weken	0,7	0,7	0,6	0,6
21 weken	1,0	1,1	1,0	1,0

Hoe groot het aantal coccen was in melk en kaas daaruit bereid, is aangegeven in fig. 6 (blz. 36). Het aantal is opgegeven per ml melk resp. per 0,1 g kaas.

Fig. 7 (blz. 36) geeft het verloop weer van het aantal micrococcen tijdens de rijping van kaas die bij een soortgelijke proef werd bereid. Ook hier werd de gepasteuriseerde melk geënt met 0,03% van een culture van stam 19 a. Het aantal tellingen tijdens de bereiding en het begin van de rijping was hierbij groter. Na het pekelen nam het aantal af.

Uit de tabel blijkt, dat het zuurgetal van het vet niet merkbaar stijgt t.o.v. kaas bereid uit dezelfde niet geënte gepasteuriseerde melk en dat dus de micrococcen die wij isoleerden, niet in staat waren het vet in kaas af te breken. Uit fig. 6 en 7 blijkt, dat weliswaar in het begin van de bereiding een sterke stijging van het aantal micrococcen optreedt maar dat na 3 weken het aantal reeds belangrijk is gereduceerd. Ook in kaas sterven deze coccen, die in het begin van de bereiding nog groeimogelijkheden bezitten, dus ook vrij spoedig af. De reductie van het aantal geschiedt echter belangrijk langzamer dan dat bij het geslacht *Pseudomonas* en de *Achromobacteriaceae* het geval is. Het is dan ook niet verwonderlijk, dat deze organismen vaak kweekbaar zijn uit kaas.

Resumerend mogen wij de voorlopige conclusie trekken, dat de micrococcen weinig bijdragen tot de vethydrolyse tijdens de kaasrijping. Er zal uitvoeriger onderzoek nodig zijn om met zekerheid te concluderen, of deze organismen enige invloed hebben bij de veranderingen die in kaas plaats vinden.

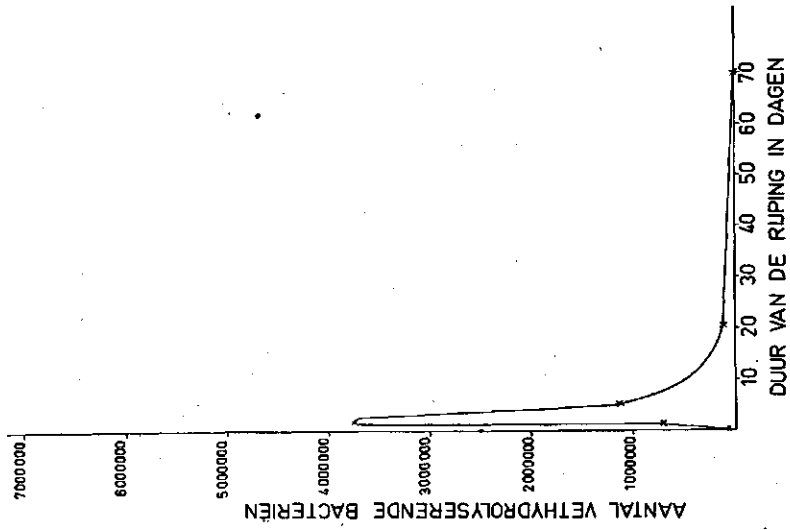

FIG. 7. Groei en afsterven van micrococcen tijdens de bereiding en rijping van kaas.

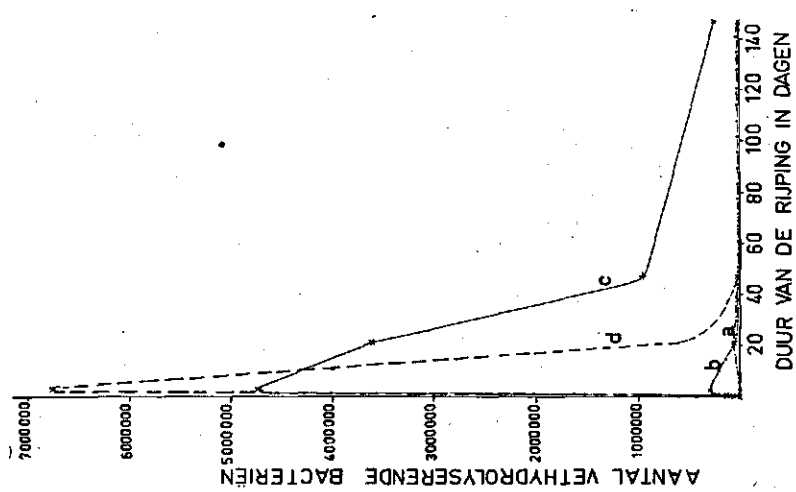

FIG. 6. Groei en afsterven van micrococcen tijdens de bereiding en rijping van kaas. a. niet geënt. b. geënt met 0,03 % van een culture van 19a. c. geënt met 0,03 % van een culture van 22m. d. geënt met 0,03 % van een culture van 29f, van 32e en van 33b.

b. De invloed der melkzuurbacteriën op de vetsplitsing

De melkzuurbacteriën staan niet bekend als micro-organismen, die in staat zijn botervet af te breken (PETTE, 1953). Deze organismen zijn echter ook niet bekend als bacteriën, die bij uitstek in staat zijn eiwit te hydrolyseren. Toch wordt van verschillende vertegenwoordigers van de lactic-groep nl. van de soorten *Str. lactis* en *Str. cremoris* en van het geslacht *Streptobacterium* beweerd, dat zij na autolyse in kaas een enzym nalaten dat in staat is in kaas eiwit af te breken. Onderzoekingen zijn over deze onderwerpen b.v. verricht door FREUDENREICH (1891) en door VAN DER ZANT en NELSON (1954). Deze onderzoekingen nopen ons bij de studie van de vetsplitsing tot voorzichtigheid bij het trekken van conclusies.

Dat vertegenwoordigers van de streptococcen van de lactic-groep (*Str. lactis* en *Str. cremoris*) bij kunnen dragen tot de vetontleding tijdens de kaasrijping, is echter wel onwaarschijnlijk. Wij konden immers soms in kaas, bereid uit gepasteuriseerde melk waaraan de normale hoeveelheden zuursel waren toegevoegd, zelfs na 30 weken geen vetsplitsing aantonen.

Toch wordt in de literatuur gesproken over een lipase afkomstig van melkzuurbacteriën (WOLF, 1941) en wat de kaasrijping betreft veronderstellen PETERSON en JOHNSON (1949), dat de in kaas groeiende streptobacteriën bij zouden kunnen dragen tot de vethydrolyse tijdens de kaasrijping. Zij konden immers met behulp van zeer gevoelige chromatografische methode boterzuur en capronzuur aantonen in een 2 maanden oude culture van bepaalde streptobacteriën in wei, waarin botervet was geëmulgeerd.

Behalve deze streptobacteriën zijn uit kaas enterococcen (*Str. faecalis* en *Str. liquefaciens*) en betabacteriën kweekbaar.

Over de betekenis voor de vetsplitsing van de 3 genoemde bacteriegroepen werd een oriënterend onderzoek verricht. Hiertoe entten wij 17 stammen waarvan 9 streptobacteriën, 6 enterococcen (aangeduid als *Str. faecalis*) en 2 betabacteriën in room met een vetpercentage van 15%, waaraan 5 g krijt per 100 ml was toegevoegd. De staafvormige melkzuurbacteriën waren gedetermineerd volgens TITTSLER (1947). De streptococcen waren gedetermineerd op de wijze zoals dat in BERGEY'S MANUAL (1948) staat vermeld. Een onderscheid tussen *Streptococcus faecalis* en *Streptococcus liquefaciens* werd niet gemaakt. Na 2 maanden bij 15°C werd de stijging van het zuurgetal van het roomvet nagegaan.

TABEL 30. *De invloed van enige melkzuurbacteriën op de vethydrolyse in room*

No.	Soort	Zuurgetal van het vet		No.	Soort	Zuurgetal van het vet		No.	Soort (geslacht)	Zuurgetal van het vet	
		direct	na 2 mnd.			direct	na 2 mnd.			direct	na 2 mnd.
1	*Lb. plantarum*	0,2	0,4	6	*Lb. caseï*	0,2	0,9	11	*Str. faecalis*	0,3	0,3
2	*Lb. plantarum*	0,2	0,4	7	*Lb. caseï*	0,2	0,9	12	*Str. faecalis*	0,3	0,3
3	*Lb. plantarum*	0,2	0,4	8	*Lb. caseï*	0,2	0,7	13	*Str. faecalis*	0,3	0,3
4	*Lb. plantarum*	0,2	0,5	9	*Lb. plantarum*	0,3	0,6	14	*Str. faecalis*	0,3	0,3
5	*Lb. caseï*	0,2	0,8	10	*Str. faecalis*	0,4	0,4	15	*Str. faecalis*	0,3	0,3
								16	*Betabacterium*	0,2	0,3
								17	*Betabacterium*	0,2	0,6

In tabel 30 blijkt, dat enige zwakke vetsplitsers werden gevonden vooral onder de *Lactobacilli caseï*. De genoemde onderzoekingen van PETERSON en JOHNSON

(1949), waarbij lagere vetzuren konden worden aangetoond, zijn dus waarschijnlijk in overeenstemming met de resultaten die wij verkregen. De vraag is nu, of in kaas deze vetsplitsende micro-organismen van enige betekenis zijn. Daartoe voegden wij één week oude ondermelkcultures van enige der bovengenoemde bacteriën toe aan gepasteuriseerde melk en bepaalden van de kaas, daaruit bereid, de verandering van het zuurgetal van het kaasvet. Om de proef te bekorten zijn aan dezelfde portie kaasmelk verscheidene cultures tegelijk toegevoegd. Tabel 31 bevat de resultaten.

TABEL 31. *De invloed van enige melkzuurbacteriën op de vetontleding in kaas*

Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet					
	Geen toevoeging	Toegevoegd 0,05% van cultures van ieder der volgende *Lactobacillus* stammen (zie: tabel 30) No. 2, 3, 6, 7 en 9	Geen toevoeging	Toegevoegd 0,07% van een culture van Stam 5 (zie: Tabel 30)	Geen toevoeging	Toegevoegd 0,1% van een culture van Stam 10, 11, 12, 13, 14 en 15 (zie: Tabel 30)
3 weken	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
6 weken	0,6	0,7				
9 weken	0,8	0,7				
10 weken			0,9	0,8	0,6	0,6
19 weken	1,5	1,6				
20 weken				1,1	0,9	0,9
30 weken	2,3	2,3	1,2	1,3		

Uit de tabel blijkt, dat de lipase geproduceerd door de onderzochte stammen niet in staat is in kaas enige vethydrolyse teweeg te brengen. De proeven doen vermoeden, dat de lipasen die in kaas vet ontleden, waarschijnlijk niet geproduceerd worden door de melkzuurbacteriën.

c. De invloed van vertegenwoordigers van het geslacht Bacterium en Corynebacterium

In melk, zowel in normaal gewonnen rauwe melk als in „aseptisch" gewonnen melk, maar ook op kaas kan men vaak grampositieve staafvormige micro-organismen vinden. Deze soorten kenmerken zich vaak door hun mogelijkheid te groeien in media met zoutconcentraties tot 20%. Het is dan ook geen wonder, dat deze organismen vaak in kaaspekel gevonden worden, als de pekel niet te zuur is. Met behulp van de microscoop zijn zij meestal goed te herkennen aan de wijze waarop de cellen gerangschikt zijn. De cellen liggen vaak in een V-vorm of pallisade-gewijs. Deze zeer opvallende eigenschap der corynebacteriën beperkt zich echter jammer genoeg niet tot deze familie maar wordt ook bij microbacteriën gevonden (GALESLOOT, 1951). Ook konden wij hetzelfde opmerken bij soorten die nauw verwant bleken te zijn aan *B. linens*. Hiermede zijn wij dan direct beland bij de moeilijkheden, die de determinatie van deze nauw met elkaar verwante organismen (MARY SANDS, 1953) ons heeft bezorgd. De indeling zoals aangegeven door DREWES (1937) lijkt ons te weinig uitvoerig om bruikbaar te zijn. JENSEN (1934) geeft zeer uitvoerige beschrijvingen voor saprophytische corynebacteriën geïsoleerd uit grond maar de door ons geïsoleerde micro-organismen vermochten wij op een enkele uitzondering na niet te identificeren als een van de door hem beschreven soorten.

Wij onthouden ons dan ook van het opstellen van een determinatietabel. Deze zou immers alleen te geven zijn na een uitvoerige studie. In tabel 32 zijn 64 van deze bacteriën in 4 kolommen gerangschikt.

TABEL 32. *De eigenschappen van het aantal grampositieve, staafvormige bacteriën, geïsoleerd van melk en kaas*

1) De bepaling van eigenschappen van een aantal grampositieve, staafvormige bacteriën, geïsoleerd van melk en kaas

Groei in anaëroob milieu bij pH 7,0
Voedingsbodem: per 1000 ml: 15 g agar, 5 g pepton, 3 g bouillon, 5 g gistextract en 10 g glucose; pH 7,0
Na enten gedurende 14 dagen wegzetten onder waterstof bij 15 à 16 °C.

Eiwitarme voedingsbodem (JENSEN, 1934).
Voedingsbodem: per 1000 ml: 10 g glucose, 1 g asparagine, 1 g K_2HPO_4, 0,5 g $MgSO_4$, 0,5 g NaCl en 20 g agar
Beoordeling op groei na 7 dagen bij 25 °C.

2) Overzicht van de eigenschappen en de herkomst van een aantal grampositieve, staafvormige bacteriën, geïsoleerd van melk en kaas.

	I	II	III	IV
Aantal	21	8	32	3
Gelatinevervloeiing	0	7	32	3
Zuurvorming uit glucose (aëroob)	7	5	0	3
Groei in anaëroob milieu bij pH 7,0	21	7	0	3
Kleur	wit	oranje na lange tijd	oranje	geel
Nitraatreductie	6	6	21	0
Eiwitarme voedingsbodem	18	6	27	0
Zuurvaste kleuring	0	0	0	0
Vetsplitsing in room bij pH 5 en 5% NaCl; stijging van het zuurgetal van het roomvet:				
0–0,1	17	7	30	3
0,1–1,0	3	1	2	0
>1,0	1	0	0	0
Herkomst: „Aseptisch" gewonnen melk	4	0	0	0
Normale rauwe melk	2	0	2	3
Oppervlak kaas	16	8	30	0

In kolom I staan de corynebacteriën die ook in aseptisch gewonnen melk voorkomen. Zij kenmerken zich door hun vermogen in een exsiccator onder waterstof na 14 dagen bij pH 7,0 enige groei te vertonen. Zij zijn wit en vervloeien geen gelatine. Zij zijn aan de soort *Corynebacterium bovis* verwant. In de derde kolom zijn de obligaat-aërobe stammen ondergebracht. Zij vormen allen kleurstof op een voedingsbodem volgens HAMMER (HAMMER, 1948; ALBERT e.a., 1944), groeien uitsluitend aan het oppervlak van kaas, maken van glucose geen zuur en vervloeien allen gelatine. Het zijn echte eiwitaantasters. Ze zijn nauw verwant aan *B. linens*. In kolom II vindt men organismen, die wat hun eigenschappen betreft een overgang vormen tussen de aan *Corynebacterium bovis* en de *B. linens* verwante organismen. Kolom IV bevat 3 organismen behorend tot het geslacht *Microbacterium*.

Vele van deze organismen vooral die verwant zijn aan *Corynebacterium bovis* (kolom I) staan bekend als vetsplitsers (LONG, 1937). Om na te gaan, of deze organismen van enig belang waren bij de vetsplitsing tijdens de kaasrijping,

entten wij alle stammen in 2 dagen oude, gezuurde room, waaraan 1 dag later zout werd toegevoegd (zie hierboven). Na 4 weken bewaren bij kaasrijpingstemperatuur werd nagegaan, of er een stijging van het zuurgetal was opgetreden. Tijdens de proef werd nagegaan, of de stam goed groeide. Dit was bij alle onderzochte stammen het geval. In tabel 32 ziet men, dat slechts in enkele gevallen een belangrijke hoeveelheid lipase werd afgescheiden, die in de room bij een pH 5,0 en een NaCl-concentratie van 5 % werkzaam was. Aangezien de organismen, vermeld in groep I en II, in anaëroob milieu enige groei vertonen, ligt de vraag voor de hand, of zij in kaas groeien en het vet afbreken. Soortgelijke proeven als weergegeven in fig. 6 en 7 leerden ons, dat weliswaar in het begin van het bereidingsproces een stijging van het aantal kan optreden, doch dat na het omlopen het aantal langzaam afneemt. Bij het bereiden van kaas uit rauwe melk zal het aantal o.i. niet zo sterk stijgen, dat van een reële invloed sprake is. Bij gunstige groeimogelijkheden op de kaaskorst zullen de vetsplitsers, genoemd in de tabel, echter zozeer in aantal stijgen, dat zij misschien voor een deel het verschil in vetafbraak tussen de rand en het inwendige van de kaas veroorzaken. Voor de eiwithydrolyse echter lijken ons de obligaat-aërobe soorten van veel meer betekenis.

d. De invloed van de gisten

Zoals reeds in de inleiding vermeld is, worden op kaas vaak gisten gevonden. Ook rauwe melk kan gisten bevatten. De aantallen zijn meestal niet zo groot. Bij zachte kaassoorten is hieraan enige aandacht besteed door KELLY en MARGUARDT (1939). IYA en FRAZIER (1949) vermelden, dat vele van deze gisten in staat zijn op Limburgse kaas melkzuur af te breken. Hierdoor stijgt de pH en worden de groeimogelijkheden voor *B. linens* belangrijk gunstiger. Later vonden PURKO, NELSON en WOOD (1951), dat deze gisten de groei van *B. linens* zouden stimuleren, waarschijnlijk door het vormen van stoffen behorend tot het vitamine-B complex. Het leek van belang na te gaan, of de gisten die in melk en op kaas voorkwamen, van enige betekenis waren voor de vethydrolyse bij de kaasrijping. Ofschoon de aantallen belangrijk lager zijn dan bij zachte kaassoorten, zijn, zoals op blz. 32 bleek, deze aantallen op Nederlandse kaas toch zeker zo groot, dat het de moeite waard is na te gaan, of deze flora mede het verschil in zuurgetal tussen rand- en middengedeelte veroorzaakt. Bovendien bleek ons, dat zelfs bij een zorgvuldig schoonhouden van de kaaskorst op deze steeds nog een belangrijk aantal gisten voorkwam, dit in tegenstelling met het aantal schimmels. Er werden daarom van melk en kaas in totaal 63 stammen geïsoleerd en gedetermineerd volgens het systeem aangegeven door LODDER en KREGER-VAN RIJ (1952).

De stammen werden onderzocht op:

1. sporevorming. Er werd hierbij gebruik gemaakt van GORODKOWA-agar.
2. de assimilatie en fermentatieve dissimilatie van glucose, galactose, maltose, lactose en saccharose.
3. de assimilatie van nitraat.
4. de groeimogelijkheden in een medium met C_2H_5OH als C-bron.
5. de wijze van groei in moutextract.
6. de afbraak van melkzuur. Hierbij werd nagegaan, hoe de pH veranderd was na 10 dagen in een voedingsvloeistof bestaande uit 0,6 % gistextract en 2 % melkzuur (pH 5).
7. tributyrine-splitsing.

8. de hydrolyse van roomvet bij pH 5 en 5 % NaCl bij aanwezigheid van zuurstof.

In tabel 33 is aangegeven, of de verschillende geslachten der onderzochte gisten melkzuur, tributyrine en botervet konden afbreken. De onderzochte gisten vertoonden allen een zwakke of geen fermentatieve dissimilatie en waren in het algemeen sterk aëroob.

TABEL 33. *Overzicht van enige eigenschappen van 63 giststammen geïsoleerd van melk, van het kaasoppervlak en van pekel*

	Geslacht			
	Candida	*Torulopsis*	*Debaryomyces*	*Rhodotorula*
Aantal	11	4	46	2
Afbraak van melkzuur	11	2	24	0
Vetsplitsing: 1. tributyrine	11	4	46	2
2. room bij pH 5 en 5% NaCl; stijging van het zuurgetal: 0–0,1	3	3	22	2
0,1–1,0	0	1	22	0
1,0–5,0	2	0	2	0
>5,0	6	0	0	0
Herkomst: Rauwe melk	7	3	3	0
Oppervlak van kaas	4	1	42	2
Pekel	0	0	1	0

Uit de tabel volgt, dat vele gisten in staat zijn onder de omstandigheden die in kaas heersen kaasvet in geringe mate af te breken. Gezien de vrij grote aantallen, die op kaas kunnen voorkomen, zal dit vethydrolyserend vermogen zeker mede het verschil in zuurgetal tussen het rand- en het middengedeelte van kaas veroorzaken.

e. De invloed van de schimmels

In Nederland vindt men het in het algemeen ongewenst, dat er schimmels op kaas groeien. In de praktijk worden dan ook vele middelen aangewend deze schimmelgroei zoveel mogelijk te beperken. Toch zal op de kaaskorst meestal nog een vrij groot aantal schimmels kunnen groeien.

Op jonge kaas komt meestal vooral *Oöspora lactis* voor. Wat later vindt men in afhankelijkheid van o.a. de wijze van bewaren groei van schimmelsoorten die vooral behoren tot het geslacht *Mucor*, *Aspergillus* en *Penicillium*. Zij zijn gevoeliger voor zout dan *Oöspora lactis*. Om een indruk te krijgen van hun invloed op de vethydrolyse zijn 17 schimmels geënt in gezuurde, zoute room (tabel 34). Voor de determinatie van de schimmels werd gebruik gemaakt van beschrijvingen van SMITH (1938) en van HENRICI (1948).

Naar aanleiding van de gegevens in tabel 34 mag worden verwacht, dat deze schimmels in staat zijn een sterke vethydrolyse op de kaaskorst tot stand te brengen. Tevens zij opgemerkt, dat de hier beschreven organismen geïsoleerd van de kaaskorst misschien niet alleen vet afbreken tot glycerine en vetzuren, maar ook in staat zijn de hydrolyseproducten af te breken. In hoeverre dit bij kaas het geval is, is niet nader onderzocht. Bovendien onderzochten wij niet, in hoeverre de beschreven organismen in andere opzichten bij de kaasrijping van invloed zouden kunnen zijn.

TABEL 34. *Het vethydrolyserend vermogen van een aantal schimmels*

	Geslacht			
	Oöspora	*Mucor*	*Aspergillus*	*Penicillium*
Aantal	6	4	2	5
Vetsplitsing in room bij pH en 5% NaCl; stijging van het zuurgetal: 0,0– 1,0 . .	0	0	0	0
1,0– 5,0 . .	1	0	2	0
5,0–10,0 . .	1	0	0	2
10,0–50,0 . .	3	3	0	1
>50,0 . .	1	1	0	2

f. Over de invloed der gramnegatieve staafvormige bacteriën

α. de coli-aërogenesbacteriën (*Eschericheae*)

Het voorkomen van deze groep van micro-organismen in rauwe melk is voldoende aanleiding om enkele oriënterende proeven uit te voeren over een eventuele invloed van deze bacteriën op de vethydrolyse in kaas. Daartoe werden 14 stammen gedetermineerd volgens de methode van WILSON (1935) en geënt in steriele room.

De 14 stammen konden als volgt worden ingedeeld:

1 *B. coli* I
3 Intermediair type I
2 Intermediair type Ia
7 *B. aërogenes* I
1 *B. aërogenes* II

Na 14 dagen bebroeden van de room bij 16 °C bleek een zeer sterke groei der organismen opgetreden te zijn. Het zuurgetal van het roomvet was echter in het geheel niet gestegen.

β. vertegenwoordigers der *Serrateae*, der *Pseudomonas*-soorten en der *Achromobacteriaceae*

Het is algemeen bekend, dat vertegenwoordigers van deze families bij uitstek in staat zijn vet af te breken. In steriele room geënt, gaven zij dan ook practisch zonder uitzondering grote stijgingen in het zuurgetal van het vet te zien. Op blz. 17 en 29 zagen wij, dat deze vethydrolyserende bacteriën in kaas snel afsterven. Omdat zij in rauwe melk veel voorkomen, hebben wij ons afgevraagd, of zij toch in staat zijn een invloed op de vetontleding in kaas uit te oefenen, doordat zij na afsterven enzymen achterlaten die vet in kaas kunnen ontleden. Als dit het geval zou zijn, dan zou het misschien mogelijk zijn een eerste verband te leggen tussen de samenstelling van de bacteriële flora van de rauwe melk en de kwaliteit van de daaruit bereide kaas. Behalve na autolyse kunnen deze bacteriën ook tijdens hun groei in melk lipase in het milieu afscheiden. Naar aanleiding van de proeven besproken op blz. 20 lijkt het waarschijnlijk, dat ook deze lipase bij het stremmen van de melk voor een groot deel in de wrongel wordt opgenomen. Indien deze bacteriën van belang zijn bij de vethydrolyse tijdens de kaasrijping, dan zullen zij in een aantal dat in de orde van grootte van het kiemgetal van rauwe melk ligt, reeds een duidelijk merkbare vethydrolyse teweeg moeten brengen onder omstandigheden zoals die in kaas heersen d.w.z. bij een pH 5 en een zoutconcentratie van ± 5% in het vocht. Van de door ons uit melk ge-

isoleerde stammen hebben wij dit op de volgende wijze nagegaan. Een oogje van een suspensie in steriel water van de bacteriestam werd geënt in 25 ml steriele ondermelk. Na 21 uur bebroeden bij 25 °C werd in de ondermelk een telling uitgevoerd. De bacteriën werden geteld volgens een gewijzigde BREED-methode. Direct na de monstername voor het tellen werd aan het overige deel 0,1% van een culture van *Str. lactis* toegevoegd. Hierdoor zal, zoals op blz. 30 is gebleken, de bacteriestam in haar groei belemmerd worden. Nadat het aantal kiemen volgens BREED was bepaald, werd 24 uur na het begin van de proef zoveel van de culture van de bacteriestam toegevoegd aan 50 ml steriele room met een vetgehalte van 30%, dat deze room 5.000.000 kiemen/ml van de bacteriestam bevatte. Na 24 uur staan bij kamertemperatuur werd aan de room een steriele zoutoplossing toegevoegd en wel zoveel, dat in het roomplasma een concentratie van 5% zout ontstond. De monsters werden gedurende 4 weken onder stikstof weggezet bij 16 °C. Alsdan werd de stijging van het zuurgetal bepaald. Bij het opstellen van het proefschema is van de gedachte uitgegaan, dat de omstandigheden zoveel mogelijk gelijk moesten zijn aan die welke bij de kaasbereiding gelden. Als wij veronderstellen, dat het aantal kiemen in pas bereide kaas ± 7 maal groter is dan in melk (PETTE en SJOLLEMA, 1951), dan komt een aantal vetsplitsers van 5.000.000 in kaas overeen met een aantal van ± 700.000 in de melk. Het aantal bepaald met de grote-plaatmethode zal dan nog aanmerkelijk lager liggen. In tabel 35 vindt men de uitkomst van de proeven die wij met een

TABEL 35. *Overzicht van de eigenschappen van vertegenwoordigers der Serrateae, der Pseudomonas-soorten en der Achromobacteriaceae*

	Serratia	*Pseudomonas*	*Achromobacter*	*Alcaligenes*	*Flavobacterium*
Aantal	2	20	5	26	5
Beweeglijkheid	0	18	0	0	0
Gelatinevervloeiing	2	18	0	1	5
Groei bij: 8 °C	2	17	5	25	3
37 °C	2	4	1	3	1
Groei in lakmoesmelk:					
alcalisch	0	0	0	14	0
zuur	0	2	2	0	0
eiwitaantasting	2	14	0	0	4
reductie	2	4	5	18	1
Zuur uit glucose	2	17	5	0	2
Gas uit glucose	0	0	0	0	0
O_2: obligaat aëroob	2	19	5	26	1
anaëroob	0	0	0	0	0
niet obligaat aëroob	0	1	0	0	4
Vetsplitsing:					
1. tributyrine	2	20	5	26	5
2. botervet (methode Dorner)	2	15	3	21	4
3. room pH 5 en 5% NaCl, anaëroob; stijging van het zuurgetal:					
0–0,1	0	14	2	16	5
0,1–0,5	0	2	1	7	0
0,5–1,0	0	2	1	0	0
>1,0	2	2	1	3	0
Plaats van herkomst:					
rauwe melk	2	18	4	17	1
jonge rauwe kaas	0	2	0	1	3
gepasteuriseerde melk	0	0	1	8	1

aantal van deze organismen uitvoerden. In de tabel zijn tevens enige physiologische eigenschappen der onderzochte stammen vermeld. Een onderverdeling in soorten is niet gemaakt.

In tabel 36 zijn nog enige voorbeelden vermeld waarbij kaas bereid is uit melk waaraan een culture van een *Pseudomonas*, *Achromobacter* of *Alcaligenes* soort is toegevoegd. Dat hier van een zeer reële invloed sprake is, is naar onze mening zonder verklaring duidelijk.

TABEL 36. *Het toevoegen van cultures van aërobe, gramnegatieve, vethydrolyserende bacteriën aan melk en de vethydrolyse in de daaruit bereide kaas*

A	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk geënt met een culture van een *Achromobacter* (stam 23o)	
Aantal vetsplitsers per ml melk	20		232 000	
Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
2 weken	0,6	goed	3,9	kaassmaak
6 weken	0,8	geen kaassmaak	8,4	kaassmaak
11 weken	0,8	geen kaassmaak	12,9	iets rans; vetzuurbitter
B	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk geënt met een culture van een *Alcaligenes* (stam 23a)	
Aantal vetsplitsers per ml melk	130		253 000	
10 weken	1,1	goed	6,3	kaassmaak; vetzuurlucht
25 weken	2,0	geen kaassmaak	14,2	kaassmaak; iets vetzuurbitter
C	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk geënt met een culture van een *Pseudomonas* (stam 31h)	
Aantal vetsplitsers per ml melk	10		990 000	
3 weken	0,8	goed	1,0	weinig kaassmaak
11 weken	0,9	geen kaassmaak	1,8	enige kaassmaak; bitter
26 weken	1,1	geen kaassmaak; nasmaak bitter	3,6	kaassmaak; bitter; goor
D	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk geënt met een culture van een *Pseudomonas* (stam 31a)	
Aantal vetsplitsers per ml melk	0		1 890 000	
2 weken	0,8	goed; iets zuur	2,3	enige kaassmaak
10 weken	0,9	geen kaassmaak	6,7	kaassmaak; bitter; vetzuurbitter
20 weken	1,3	geen kaassmaak	12,0	sterke kaassmaak
30 weken	2,0	weinig smaak; goed; iets zout	14,5	sterke kaassmaak; ranzig; vetzuurbitter

g. *De invloed van de aërobe sporevormers*

Volledigheidshalve vermelden wij, dat enige der aërobe sporevormers in staat zijn botervet te hydrolyseren. Door het geringe aantal waarin zij in kaas

voorkomen, zijn zij naar onze mening niet van belang bij de vethydrolyse tijdens de kaasrijping.

4. Overzicht

1. De in melk voorkomende grampositieve, katalase-positieve, meestal aërobe coccen breken het vet in kaas niet merkbaar af.
2. Aan lipasen afkomstig van melkzuurbacteriën moet weinig waarde gehecht worden.
3. Op de kaaskorst zijn enige soorten der corynebacteriën en sommige gistsoorten, als zij in grote getale voorkomen, in staat het kaasvet in geringe mate af te breken. De schimmels daarentegen zijn in staat een belangrijke vethydrolyse teweeg te brengen. Of secundaire afbraak van de uit vet gevormde producten plaats vond, is niet nagegaan. Ook zal nog nader onderzocht dienen te worden, of de activiteit van de oppervlakteflora gewenst of ongewenst is.
4. De onderzochte coli-achtigen zijn in het geheel niet in staat botervet af te breken.
5. Sommige stammen der *Serrateae*, *Pseudomonas*-soorten en *Achromobacteriaceae* laten na afsterven in kaas een enzym na dat in staat is het vet in kaas af te breken.

HOOFDSTUK V

STERIELE PREPARATEN VAN VETSPLITSENDE ENZYMEN VAN BACTERIËLE OORSPRONG

1. Het bereiden van actieve enzympreparaten

In het vorige hoofdstuk hebben wij gezien, dat er onder de *Serrateae*, de *Pseudomonas*-soorten en de *Achromobacteriaceae* sommige stammen zijn die niet in kaas kunnen groeien maar die toch van belang kunnen zijn voor de kaasrijping, omdat zij in het milieu voor of na afsterven een enzym kunnen achterlaten dat in kaas werkzaam kan zijn. Wanneer wij in staat zouden zijn van de bacteriëncellen de enzymen vrij te maken en in oplossing te brengen, zouden deze enzymoplossingen na toegevoegd te zijn aan kaasmelk in de daaruit bereide kaas een hydrolyse van het vet moeten veroorzaken. Het ging er dus in de eerste plaats om een actief preparaat te bereiden.

Er zijn talrijke methoden beschreven om enzymen uit cellen vrij te maken. Hugo (1954) gaf hiervan een uitvoerig overzicht. Willstätter (1923) ontwikkelde voor het bestuderen van de lipase voorkomend in de pancreas een methode om actieve extracten te bereiden. Tammisto (1933) paste dezelfde methode toe om lipasen uit bacteriëncellen vrij te maken. Dezelfde methode werd ook door ons toegepast. De cellen werden uit de voedingsoplossing door centrifugeren afgescheiden. Als voedingsoplossing werden trypton- of peptonoplossingen met enige voedingszouten gebruikt. Het sediment werd verzameld met zo weinig mogelijk steriel water en gedroogd met behulp van een ongeglazuurd porceleinen bord gedurende 18 uur. Het gedroogde materiaal werd verzameld en gedurende 4 dagen geëxtraheerd met een oplossing van de volgende samenstelling:

40 delen glycerine
57 delen van een 1% $(NH_4)_2$ HPO_4 opl.
3 delen ammonia 1/10 N.

Met melkzuur werd de pH ingesteld tot neutraal of iets zuur. Om de autolyse der cellen te bevorderen werd toluol toegevoegd. Van de aldus verkregen oplossing werd nagegaan, of zij actief lipase bevatte. Hiertoe werd een kolfje van 100 ml gevuld met 10 ml vloeibaar botervet van 37°C en 2 ml van een bufferoplossing volgens Mc. Ilvaine (1921). Het is mogelijk op deze wijze de activiteit van het enzym bij verschillende pH-waarden te meten. Na steriliseren werd de inhoud van het kolfje afgekoeld tot 37°C. Daarna werd de inhoud gedurende 0,5 minuut gemengd; er werd één ml of een 0,5 ml enzymextract toegevoegd, waarna wederom één minuut voorzichtig werd gemengd. Hierna werd het kolfje onmiddellijk in de koelkast geplaatst om het vet vast te laten worden. Na 2 uur werden de kolfjes onder waterstof weggezet bij 16°C. Hieronder volgen een tweetal voorbeelden, waarbij de invloed van de pH op de activiteit van bacteriële lipasen nader werd bestudeerd.

2. De invloed van de pH op de activiteit van bacteriële lipasen

Stam 23a (*Alcaligenes viscosus*) werd geënt in 10 kolven, die ieder 500 ml voedingsoplossing van de volgende samenstelling bevatten: 2% pepton, 1‰ $MgSO_4$, 2‰ KH_2PO_4. Na 5 dagen bebroeden bij 15°C werden de cellen afgescheiden door de voedingsoplossing gedurende 1 uur in steriele buizen te centrifugeren. Het toerental van de centrifuge was daarbij 3000 per minuut. Het sediment werd verzameld en gedroogd. Er bleek een hoeveelheid van 1,1 g droog materiaal aanwezig te zijn. Hieraan werd 15 ml glycerine-phosphaatmengsel (pH 7,0) en 0,25 ml toluol toegevoegd. Na 10 dagen staan bij 6°C bleek het extract steriel te zijn. Er waren dan na uitzaaien op de voedingsbodem bestaande uit trypton, tributyrine en agar geen kiemen meer kweekbaar. De activiteit werd bepaald bij de volgende pH-waarden: 4,7; 5,0; 5,3; 5,6; 6,0; 7,0 en 8,0. Dit kan gemakkelijk geschieden door aan het botervet 2 ml van een citroenzuur-phosphaatbuffer met de verlangde pH toe te voegen. Er werd een halve ml enzymextract toegevoegd. Na 4 weken bewaren bij 16°C werd het zuurgetal bepaald.

Op soortgelijke wijze werd stam 23 h (*Pseudomonas fluorescens*) geënt in een voedingsoplossing met de volgende samenstelling: 1% pepton, 0,5% vleesextract, 1‰ $MgSO_4$ en 2‰ KH_2PO_4. Na 1 week werd gecentrifugeerd. Er bleek na drogen 3 g droog materiaal aanwezig te zijn. Dit werd gesuspendeerd in 60 ml glycerine-phosphaatmengsel. Hieraan werd 1 ml toluol toegevoegd. Na 9 dagen bewaren bij 6°C was het preparaat steriel en werd het met botervet gemengd.

De uitkomsten van beide proefnemingen zijn weergegeven in tabel 37 en in figuur 8.

Uit de tabel en de figuur blijkt, dat de enzymen optimaal werkzaam zijn bij een pH van 6 à 7. Naarmate de pH lager wordt daalt de activiteit.

3. Enzympreparaten en de vetsplitsing in kaas

In het bijzonder waren wij geïnteresseerd in de mogelijkheid om door het toevoegen van steriele enzymextracten aan gepasteuriseerde kaasmelk vetsplitsing

TABEL 37. *De invloed van de pH op de activiteit van bacteriële lipasen*

pH	Begin zuurgetal	Stam 23a na 4 weken bij 16 °C	Stam 23h na 2 weken bij 16 °C
4,7	0,7	2,0	1,4
5,0	0,7	2,8	1,7
5,3	0,7	4,7	1,8
5,6	0,7	5,1	1,7
6,0	0,7	6,2	2,2
7,0	0,7	6,2	2,1
8,0	0,7	4,4	1,7

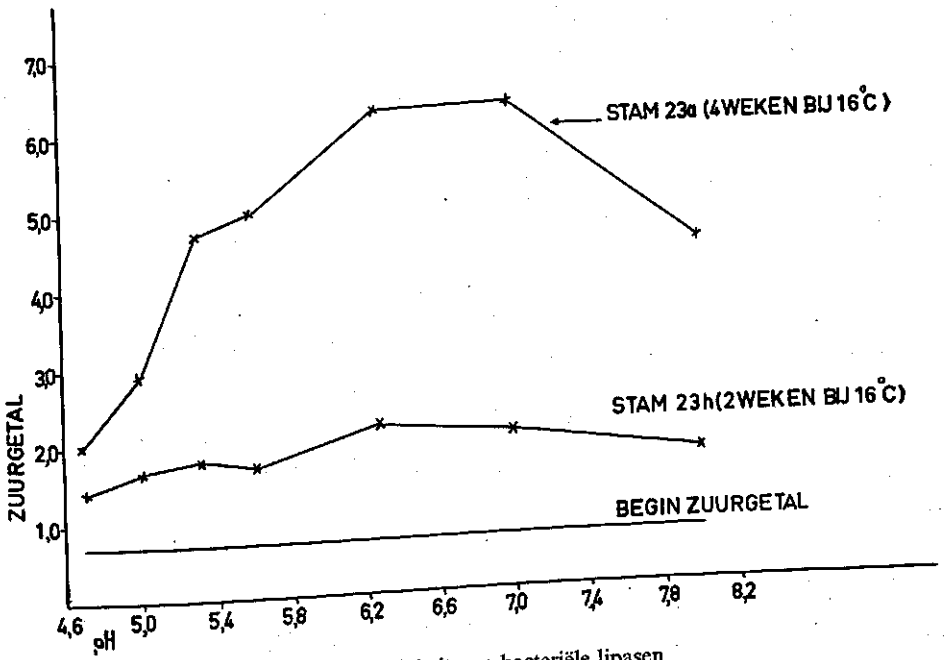

FIG. 8. De invloed van de pH op de activiteit van bacteriële lipasen

teweeg te brengen in kaas. Daartoe werd stam 9a (*Pseudomonas*) geënt in 4 kolven die ieder 500 ml van een 1% tryptonoplossing bevatten. Na 4 dagen bebroeden bij 25 °C werd op de gebruikelijke wijze gecentrifugeerd. Het celmateriaal werd gedroogd, gewogen en geëxtraheerd met het eerder genoemd glycerine-phosphaatmengsel (pH 7,0). Er werd echter niet 40 maar 20 ml van het mengsel per gram droog materiaal toegevoegd. Na 4 dagen werd 40 liter gepasteuriseerde melk bedeeld met 15 ml van het enzymextract. In tabel 38 (blz. 48) onder A blijkt, dat de hoeveelheid vrijgekomen vetzuren zelfs zo groot is, dat zij een ongunstige invloed hebben op de smaak van de kaas. Onder B is een soortgelijk geval vermeld. Hierbij is aan 18 l gepasteuriseerde kaasmelk resp. 2 en 4 ml extract toegevoegd van hetzelfde enzymextract van stam 23a (Alcaligenes viscosus) als vermeld is op blz. 46.

Uit de tabel volgt, dat het mogelijk is met enzymextracten vetsplitsing in kaas

te bewerken. De factoren die de activiteit van een dergelijk enzymextract beinvloeden, dienen nog nader onderzocht te worden.

TABEL 38. *De invloed van het toevoegen van bacterie-extracten op de vetsplitsing in kaas*

A	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk waaraan toegevoegd werd 15 ml extract/40 l melk	
Aantal vetsplitsers	180		335	
Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
3 weken	1,2	goed	10,1	enige kaassmaak
10 weken	0,9	geen kaassmaak	20,7	smaak van rauwe kaas; vetzuurbitter
15 weken	1,1	geen kaassmaak	32,4	in sterke mate vetzuurbitter
20 weken	1,1	geen kaassmaak	42,1	te sterk; vetzuurbitter
B	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk		Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk + 2 ml enzymextract	
Aantal vetsplitsers per ml	10		10	
6 weken	0,8	geen kaassmaak	1,3	enige kaassmaak
26 weken	1,3	geen kaassmaak	2,3	zeer goede kaassmaak
	Kaas bereid uit gepasteuriseerde melk + 4 ml enzymextract			
Aantal vetsplitsers per ml	0			
6 weken	2,2	goede kaassmaak; niet geheel zoals rauwe kaas		
26 weken	7,1	sterke kaassmaak; iets afwijkend		

HOOFDSTUK VI

KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE IN KAAS, UIT VET GEVORMDE VRIJE VETZUREN

1. INLEIDING

Het zuurgetal van een vet is een maat voor de hoeveelheid vrije vetzuren die in dit vet aanwezig zijn. Zowel de lagere als de hogere vetzuren dragen bij tot het zuurgetal. Het zijn echter vooral de lagere vetzuren van het melkvet (boterzuur, capron-, capryl- en caprinezuur) die voor de smaak van kaas van grote betekenis zijn. De hogere vetzuren zijn nagenoeg smakeloos. Teneinde een indruk te krijgen, in hoeverre het zuurgetal van het vet in verband gebracht kan worden met de smaak, is het van belang na te gaan, of de verhouding waarin de verschillende vetzuren onder verschillende omstandigheden worden afgesplitst, nagenoeg constant is. Bovendien is het van belang te weten, of sommige vetzuren sneller worden afgesplitst dan anderen. In dit opzicht doet zich ook de vraag voor, of het ene enzym op een andere wijze het vet afbreekt dan het andere.

In het voorgaande is er immers op gewezen, dat door het toevoegen van cultures van sommige stammen der aërobe, gramnegatieve, vethydrolyserende bacteriën aan gepasteuriseerde melk in de daaruit bereide kaas de vethydrolyse kan worden versneld. Bij beantwoorden van de vraag, of in deze kaas het vet op dezelfde wijze wordt afgebroken als in kaas uit rauwe melk, zal moeten worden nagegaan, of bacteriële enzymen het vet misschien op een andere wijze afbreken dan melklipase.

Omtrent de inwerking van lipasen op vetten is al heel wat studie verricht. Veelal werd daarbij de invloed van de lengte van de C-keten van het aan glycerine veresterde vetzuur onderzocht met behulp van enkelvoudige triglyceriden.

Door COLLINS en HAMMER (1943) werd van een aantal bacteriën nagegaan, of zij in staat zijn verschillende enkelvoudige triglyceriden af te breken. Daarnaast gingen zij na, welke natuurlijke vetten door deze bacteriën werden afgebroken. Zij vonden, dat zeer veel van de onderzochte bacteriën in staat waren om tripropionine en tributyrine af te breken, maar dat bij een langere C-keten van het veresterde vetzuur, het aantal bacteriënstammen dat hydrolyse teweeg kon brengen, kleiner werd. De natuurlijke vetten werden alle door een ongeveer gelijk percentage van de onderzochte stammen gehydrolyseerd. Hieruit volgt, dat de in de literatuur bekende proeven waarbij enkelvoudige triglyceriden als substraat gebruikt werden, wel iets leren omtrent de aantastbaarheid van de verschillende enkelvoudige triglyceriden, maar weinig omtrent de aantastbaarheid van natuurlijke vetten.

De enzymatische hydrolyse van een natuurlijk vet is behalve van de lengte van de vetzuurketen en de wijze waarop de onderscheiden vetzuren veresterd zijn, volgens KRUKOSKY en SHARP (1940) ook nog afhankelijk van de physische toestand van het vet. Deze onderzoekers vonden, dat de bij 4°C nog vloeibare botervetfracties sneller door melklipase werden ontleed dan dat met hoger smeltende fracties het geval was en dat de afbraak van botervet boven 15°C zeer veel sneller verliep dan bij lagere temperatuur. Daar bij onze proeven de kazen alle bij dezelfde temperatuur werden bewaard hebben wij met een mogelijke invloed van de kristallisatietoestand van het vet geen rekening gehouden. In afhankelijkheid van de samenstelling van het vet is er wel verschil in de hoeveelheid vloeibaar vet maar bij omstreeks 16°C zullen deze verschillen betrekkelijk klein zijn en geen uitzonderlijk grote invloed uitoefenen.

Over de afbraak van kaasvet zijn slechts weinig gegevens in de literatuur te vinden. BURR en SCHLAG (1933) bepaalden van kaasvet op verschillende tijden gedurende de rijping enige vetconstanten o.a. het R.M.W.-getal. De kaasmassa werd hierbij gewreven met watervrij Na_2SO_4 en geëxtraheerd met petroleumaether. Op ongeveer gelijke wijze handelden SHEURING en TUCKEY (1947). Aangezien echter met petroleumaether niet alleen de vetzuren maar ook het onveranderde vet geëxtraheerd werd, leerden hun waarnemingen weinig of niets omtrent de vetsplitsing.

Er zijn veel onderzoekingen verricht omtrent de wijze, waarop vluchtige vetzuren in kaas kunnen worden aangetoond en bepaald. Meestal werd een gewone stoomdestillatie, een extractie met aether of een variant op deze werkwijze, op het gehele monster kaas toegepast (ORLA-JENSEN, 1904; SUZUKI, HASTINGS en HART, 1910; HISCOX, HARRISON en WOLF, 1938, 1941; SMILEY, KOSIKOWSKY en DAHLBERG, 1946; KOSIKOWSKY en DAHLBERG, 1946). Ter bepaling van de vluchtige vetzuren pasten PETERSON en JOHNSON (1949) een chromatografische methode toe. De te analyseren monsters werden hierbij met

aether geëxtraheerd. Veel analyses van het gehele monster kaas geven weinig inzicht in de vetsplitsing, omdat de vetzuren dikwijls niet kwantitatief uit de kaas werden verkregen. Bovendien worden niet alleen de vetzuren afkomstig van het vet bepaald, doch ook zuren van andere herkomst. Zo kunnen bij de vergisting van melksuiker, mierenzuur en azijnzuur en bij de vergisting van melkzuur, propionzuur en boterzuur ontstaan.

Om een inzicht te verkrijgen in de afbraak van het vet tijdens de kaasrijping is het dus noodzakelijk de uit het vet gevormde producten uit kaas af te zonderen zonder verontreiniging met andere zuren. De vetzuren die bij de afbraak van kaasvet ontstaan, zijn allen goed oplosbaar in het vet en zij zullen dus bij afzonderen van het vet voor het overgrote deel in het vet opgelost blijven. Tesamen met het vet kunnen de vetzuren op verschillende wijzen van de overige bestanddelen van kaas gescheiden worden. WINDISCH (1901) loste de overige bestanddelen op in sterk zoutzuur en schepte het te onderzoeken vet tesamen met de vetzuren na opromen af. SANDELIN (1939) scheidde het kaasvet van de overige bestanddelen door het eiwit op te lossen in een 30%-ige oplossing van rhodaanammonium en het vet af te centrifugeren. Het vet kan ook worden gewonnen door een suspensie van kaas in water te karnen en de verkregen boter te smelten.

De methode van LANE en HAMMER (1939), waarbij kaas na mengen met zand bij niet te lage temperatuur werd uitgeperst en het vet na centrifugeren en filtreren werd verkregen (zie blz. 4), geeft hogere zuurgetallen dan de andere genoemde methoden, zoals door RAADSVELD en MULDER (1949) duidelijk werd aangetoond. Het verlies van vetzuren was bij deze methode dus geringer dan bij de andere methoden.

De laatstgenoemde methode werd ook door ons toegepast. De verkregen vetzuren werden op de hierna beschreven wijze van het vet gescheiden en afzonderlijk of in kleine groepjes bepaald.

Om na te kunnen gaan of bepaalde vetzuren bij voorkeur worden afgesplitst, is het nodig ook de vetzuursamenstelling van het niet afgebroken vet te kennen. Dit vet werd verkregen door een deel van de kaasmelk te centrifugeren, de verkregen room te karnen, de boter te smelten en te centrifugeren en het vet te filtreren. Het vet werd bij –10 °C in dichtgesmolten buizen bewaard tot de datum van onderzoek.

2. WERKWIJZE VOOR HET BEPALEN VAN DE VRIJE VETZUREN

a. De analysemethoden

α. de bepaling van de verzadigde vetzuren

Ter bepaling van de verzadigde vetzuren werd gebruik gemaakt van een chromatografische methode van BOLDINGH (1950, 1952), zoals deze later door VAN DE KAMER en zijn medewerkers (1955) is beschreven. Bij de methode werd gebruik gemaakt van arachisolie als immobiele phase en verschillende water-aceton mengsels als mobiele phase. Met behulp van zwak gevulcaniseerd rubberpoeder wordt de arachisolie geïmmobiliseerd. Met deze methode kan men het boterzuur, het capron- en caprylzuur niet afzonderlijk bepalen. Deze zuren komen gezamenlijk in het eerste eluaat terecht. De onverzadigde vetzuren, die storen bij de bepaling der hogere vetzuren, worden verwijderd door een oxydatie met alcalische permanganaat. Omdat er bij de oxydatie lagere vetzuren worden gevormd, worden de lagere en hogere vetzuren in afzonderlijke monsters en op afzonderlijke kolommen bepaald. De door ons gevolgde werkwijze werd reeds beschreven in een mededeling betreffende de vetzuursamenstelling van botervet (STADHOUDERS en MULDER, 1956).

β. de bepaling van de twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren

Voor het bepalen van de meervoudig onverzadigde vetzuren werd gebruik gemaakt van een spectrofotometrische methode zoals deze ontwikkeld werd door BRICE, SWAIN, SCHAEFFER en AULT (1945). Ook deze methode werd door ons elders beschreven (STADHOUDERS en MULDER, 1955). Bij de methode wordt gebruik gemaakt van de absorptie door geconjugeerde twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren in het ultraviolette deel van het spectrum.

De niet-geconjugeerde meervoudig onverzadigde vetzuren worden na een verhitting gedurende 30 min. bij 180 °C kwantitatief omgezet in de geconjugeerde vormen en dan spectrofotometrisch bepaald. Gebruik makende van de wet van BEER kan onder het aanbrengen van een aantal correcties de concentratie der verschillende meervoudig onverzadigde vetzuren worden berekend.

γ. de bepaling van de overige onverzadigde vetzuren

De overige onverzadigde vetzuren kan men moeilijk bepalen, maar men kan zich hieromtrent een idee vormen door middel van een eenvoudige berekening. Uit het joodadditievermogen van de vrije vetzuren in kaasvet en het gehalte aan meervoudig onverzadigde vetzuren kan worden afgeleid, hoeveel overige onverzadigde vetzuren aanwezig zijn. Er dient de aandacht op gevestigd te worden, dat op deze wijze slechts bij benadering het oliezuurgehalte kan worden berekend.

Daar de gevolgde werkwijze reeds uitvoerig door ons werd beschreven (STADHOUDERS en MULDER, 1955, 1956), kan hier worden volstaan met te beschrijven hoe de vetzuren uit kaas werden afgezonderd en gereed gemaakt voor de analyse.

b. Het afscheiden van de vrije vetzuren uit kaasvet

α. het bepalen van de hoeveelheid vrije vetzuren

Van het uitgeperste kaasvet werd het zuurgetal bepaald, zoals beschreven werd op blz. 4. Zodoende werd de hoeveelheid vrije vetzuren per g kaasvet gevonden.

β. het afscheiden van de vetzuren ter bepaling van de lagere verzadigde vetzuren

In een Mojonnierbuis werd zoveel uitgeperst vet gewogen, dat daarin ± 1,2 mg aeq. vrij vetzuur aanwezig was. Hierbij werd 10 ml alcohol 70 % gevoegd. De buis werd even in warm water gehouden en goed geschud. De vloeistof werd getitreerd met 0,1 N alcoholische loog met phenolphtaleïne als indicator. Ook de blancowaarde van 10 ml alcohol 70 % werd bepaald. Uit de eerste titratiewaarde verminderd met de tweede en de afgewogen hoeveelheid werd het zuurgetal berekend. Deze waarde behoort gelijk te zijn aan het zuurgetal dat op normale wijze was bepaald. Nu werd onder de kraan gekoeld, waarna 0,5 ml 0,1 N alcoholische loog werd toegevoegd. Het vet werd onmiddellijk daarna verwijderd met behulp van petroleumaether (kooktraject 40–60 °C). Er werd 4 maal uitgeschud: 1 maal met 40 ml en 3 maal met 25 ml. Telkens werd de petroleumaether afgeschonken. Uit de thans vetvrije vloeistof, waarin de vrije vetzuren in de vorm van Na-zouten voorkwamen werd de alcohol voorzichtig en volledig verdampt. Er werd 5 ml sterk zoutzuur toegevoegd en zoveel water, dat het bolletje van de Mojonnierbuis juist gevuld was. De vetzuren werden geëxtraheerd met een mengsel van pentaan en aether (1:1). Er werd 5 maal geëxtraheerd, 1 maal met 40 ml en 4 maal met 25 ml. De pentaan-aether werd overgegoten in een erlenmeyer van 100 ml. Na iedere extractie werd de pentaan-aether verdampt tot bijna droog. Om te voorkomen, dat er verlies optrad van vluchtige vetzuren, werd tijdens het verdampen van de laatste 25 ml 4 ml aceton in de erlenmeyer gebracht. Na even koken werd 10 ml van een oplossing van 20 % arachisolie in aceton toegevoegd en 1 ml hiervan werd geanalyseerd met behulp van de chromatografische kolom.

γ. het afscheiden van de vetzuren voor de bepaling van de hogere verzadigde vetzuren

Er werd uitgegaan van 0,8 mg aeq. vetzuur en op dezelfde wijze gehandeld als boven is aangegeven tot aan het toevoegen van de aceton. De vetzuren werden getitreerd met 0,1 N alcoholische loog. Na het toevoegen van enige overmaat loog werd de vloeistof tot droog ingedampt. Met een alkalische permanganaatoplossing werden de onverzadigde vetzuren geoxydeerd (zie STADHOUDERS en MULDER, 1956).

δ. het afscheiden van de vetzuren voor de bepaling van de twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren

Bij de bepaling van de geconjugeerde vetzuren werd zoveel kaasvet afgewogen in een Mojonnierbuis, dat zich daarin ± 0,1 mg aeq. vrij vetzuur bevond. Aan dit vet werd 10 ml 70% alcohol toegevoegd. Er werd bij de titratie geen phenolphtaleïne toegevoegd, aangezien dit storend zou kunnen werken bij de spectrofotometrische bepaling, maar uit het zuurgetal werd berekend, hoeveel alcoholische loog 0,1 N ter neutralisatie moest worden toegevoegd. Na het toevoegen van deze berekende hoeveelheid loog + een 0,5 ml overmaat werd het vet met behulp van petroleumaether verwijderd. De alcohol werd niet verdampt aangezien op deze wijze de vetzuren voor een deel in hun isomeren zouden overgaan. In plaats daarvan werd 20 ml gedestilleerd water en 5 ml sterk zoutzuur toegevoegd. De vetzuren werden geëxtraheerd met 1 maal 40 ml en met 5 maal 25 ml pentaan. De porties pentaan werden telkens overgegoten in een erlenmeyer van 100 ml en direct daarna tot bijna droog ingedampt. Na het overbrengen van de laatste extractie werd wat iso-octaan toegevoegd, en werd de pentaan geheel verdampt. Tenslotte werden de vetzuren met iso-octaan overgebracht in een maatkolf van 50 ml. De maatkolf werd aangevuld tot een volume van 50 ml. Van de oplossing werd de optische densiteit bepaald bij de verschillende golflengten met een Unicam spectrofotometer (STADHOUDERS en MULDER, 1955).

Bij de bepaling van de niet-geconjugeerde vetzuren werd ± 0,12 mg aeq. vetzuur afgewogen. Er werd geheel gehandeld, zoals beschreven werd bij de bepaling der geconjugeerde vetzuren. Tenslotte werd echter geen iso-octaan toegevoegd maar de inhoud van de erlenmeyer werd volledig overgebracht in een buis met een doorsnede van 2,6 cm en een lengte van 21,0 cm. Na het overbrengen werd de vloeistof in de buis tot bijna droog verdampt en alkalisch gemaakt met dezelfde hoeveelheid loog als bij het begin van de bepaling was toegevoegd. Daarna werd zo goed mogelijk droog gedampt en werden de vetzuren geïsomeriseerd, zoals elders beschreven werd bij de bepaling van de niet-geconjugeerde, meervoudig onverzadigde vetzuren in botervet (STADHOUDERS en MULDER, 1955). Nu werd echter 11,0 g van de glycerineloogoplossing in een aparte buis afgewogen, verhit tot 180°C en daarna overgoten in de buis die het monster bevatte. Na de isomerisatie werd de inhoud van de buis met absolute alcohol overgebracht in een maatkolf van 100 ml.

Van de vloeistof werd de optische densiteit bepaald bij de golflengten, waarbij de twee-, drie- en viervoudig onverzadigde vetzuren maximale absorptie vertonen. Hieruit werden de gehalten aan meervoudig onverzadigde vetzuren berekend op de wijze, zoals reeds eerder werd vermeld (STADHOUDERS en MULDER, 1955).

ε. de bepaling van de hoeveelheid onverzadigde vetzuren

Hierbij werd op geheel overeenkomstige wijze als bij de bepaling van de geconjugeerde vetzuren gehandeld. Er werd zoveel kaasvet afgewogen, dat tenminste 1,2 mg aeq. vrij vetzuur aanwezig was. Bij de extractie werd afgegoten in een erlenmeyer van 300 ml en tegen het eind van het verdampen van de pentaan werd tetrachloorkoolstof in plaats van iso-octaan toegevoegd. Het joodadditievermogen in het residu werd bepaald met behulp van de oplossing volgens WIJS.

3. UITKOMSTEN

Volgens de genoemde methoden werden bij vier kazen de verzadigde vetzuren, de meervoudig onverzadigde vetzuren en het joodadditievermogen bepaald. Van twee kazen bepaalden wij alleen de verzadigde vetzuren en het joodadditievermogen. Bij de zes onderzochte kazen werden overeenkomstige bepalingen verricht in het vet van de melk waaruit de kaas werd bereid. Tabel 39 bevat de resultaten van het onderzoek. De kazen zijn opzettelijk uitgezocht; de rijping was meer of minder voortgeschreden; de omstandigheden die rijping zouden kunnen beïnvloeden, waren verschillend. Zo was kaas I een kaas, waarin het zuurgetal tijdens de rijping zeer langzaam steeg. Kaas II gaf een belangrijk sterkere stijging van het zuurgetal tijdens de rijping te zien. Kaas III vertoonde een normale stijging. Van de laatste kaas werd ook na 10 weken het gehalte aan verzadigde vrije vetzuren bepaald.

TABEL 39. *Overzicht van de samenstelling van de vrije vetzuren in kaasvet in vergelijking met hetzelfde niet gehydrolyseerde melkvet*

	Kaas I		Kaas II		Kaas III			Kaas IV		Kaas V	
	Vrije vetz. in kaasvet	Melkvet	Vrije vetz. in kaasvet	Melkvet	Vrije vetz. in kaasvet	Melkvet	Vrije vetz. in kaasvet	Vrije vetz. in kaasvet	Melkvet	Vrije vetz. in kaasvet	Melkvet
Ouderdom van de kaas	1 jaar		1 jaar		10 weken		30 weken	10 weken		20 weken	
Zuurgetal van het vet .	8,4		35,6		5,1		11,8	10,2		2,7	
Vetzuur in Mol. %:											
Boterzuur . . . . . Capronzuur . . . . Caprylzuur	6,70	11,95	9,65	12,50	8,60	13,40	11,15	7,70	13,10	8,90	14,25
Caprinezuur	5,45	3,00	7,60	5,65	6,25	5,00	5,80	4,65	5,45	5,60	4,45
Laurinezuur	3,35	3,65	5,80	10,00	5,70	4,50	4,95	5,35	4,65	5,55	4,10
Myristinezuur	13,20	11,25	14,90	12,60	13,40	13,50	15,00	11,20	13,15	12,35	11,60
Palmitinezuur	18,90	24,00	28,25	23,20	22,10	24,60	23,60	31,05	27,05	28,00	20,70
Stearinezuur	3,25	9,00	5,80	9,80	7,15	10,10	7,85	8,30	7,05	8,80	10,10
Tweev. onverz. vetz.											
geconjugeerd	–	–	1,28	1,43	–	1,63	1,77	0,63	0,51	2,05	2,09
niet-geconjugeerd . . .	–	–	1,10	0,74	–	0,51	1,33	3,07	1,12	1,06	0,46
Driev. onverz. vetz.											
geconjugeerd	–	–	0,013	0,014	–	0,018	0,011	0,004	0,015	0,039	0,026
niet-geconjugeerd . . .	–	–	0,40	0,48	–	0,82	0,66	0,36	0,64	1,94	0,55
Vierv. onverz. vetz.											
geconjugeerd	–	–	0,001	0,005	–	0,002	0,002	0	0,001	0,001	0,001
niet-geconjugeerd . . .	–	–	0,41	0,27	–	0,21	0,29	0,06	0,23	0,62	0,33
Geaddeerd J per 0,5 mg aeq. vetzuur	0,485	0,418	0,353	0,353	–	0,397	0,462	0,290	0,320	0,434	0,405

Kaas IV werd bereid uit gepasteuriseerde melk waaraan een culture van vethydrolyserende bacteriën was toegevoegd. Kaas V werd bereid uit „aseptisch" gewonnen melk. Bij deze laatste kaas zal dus voornamelijk melklipase op het vet in de kaas ingewerkt hebben. Bij wijze van voorbeeld zijn in figuur 9 de hoeveelheden van de diverse vrije vetzuren, voorkomende in het vet van kaas II, weergegeven in vergelijking met hetzelfde niet afgebroken melkvet.

4. Conclusies

Uit de gegevens vermeld in tabel 39 kan worden afgeleid, dat er geen markante verschillen zijn tussen de hoeveelheden van de diverse vrije vetzuren voorkomende in het vet van de onderzochte kazen. Hieruit volgt, dat in alle onderzochte gevallen de lagere vetzuren, die belangrijke smaakcomponenten van kaas zijn, een nagenoeg gelijk deel uitmaken van de hoeveelheid vrije vetzuren in kaasvet m.a.w. het zuurgetal is een bruikbare maat voor de hoeveelheid lagere vetzuren.

Ook verschillen de hoeveelheden van de diverse vrije vetzuren in kaasvet niet in belangrijke mate van die in het overeenkomstige melkvet. Sommige vetzuren worden dus niet belangrijk sneller afgesplitst dan andere. Tenslotte volgt uit de tabel, dat melklipase het kaasvet niet op een geheel andere wijze afbreekt dan bacteriële lipasen. In dit opzicht bestaat er dus geen bezwaar tegen het toevoegen van cultures van de genoemde bacteriën aan gepasteuriseerde kaasmelk ter verhoging van de vethydrolyse in de daaruit bereide kaas.

Zoals vermeld, was er geen sprake van grote verschillen tussen de hoeveelheden van de diverse vetzuren maar toch wil dit niet zeggen, dat er in het geheel geen verschillen waren. Zo kwamen in het melkvet in alle gevallen een weinig meer veresterde lagere vetzuren voor dan er vrije lagere vetzuren voorkwamen in het kaasvet. Dit komt waarschijnlijk doordat de lagere vetzuren voor een klein deel in de kaas zijn achtergebleven. In het melkvet was het gehalte aan niet-geconjugeerde tweevoudig onverzadigde vetzuren iets lager dan in de vrije vetzuren van het kaasvet. Bij de geconjugeerde vetzuren was deze concentratie nagenoeg gelijk. Soms waren er tamelijk grote verschillen in het joodadditievermogen van de vrije vetzuren in kaasvet en van het melkvet. In tabel 39 komt dit b.v. in het eerste voorbeeld naar voren. Dit zou misschien tot het vermoeden aanleiding kunnen geven, dat de onverzadigde vetzuren soms sterker worden afgesplitst. Nadere proefnemingen zijn echter nodig voor het trekken van een dergelijke conclusie.

HOOFDSTUK VII

VERKLARING VAN ENIGE WAARNEMINGEN OMTRENT DE VETSPLITSING TIJDENS DE KAASRIJPING GENOEMD IN HOOFDSTUK II

In de vorige hoofdstukken met name in hoofdstuk II werd een aantal omstandigheden vermeld die, zoals bij de praktische kaasbereiding en ook bij het laboratoriumonderzoek werd waargenomen, invloed hebben op de vethydrolyse tijdens de rijping. Voor de invloed van deze omstandigheden werd nog geen afdoende verklaring gegeven. Thans zal worden getracht naar aanleiding van de resultaten van het eigen onderzoek een verklaring te geven.

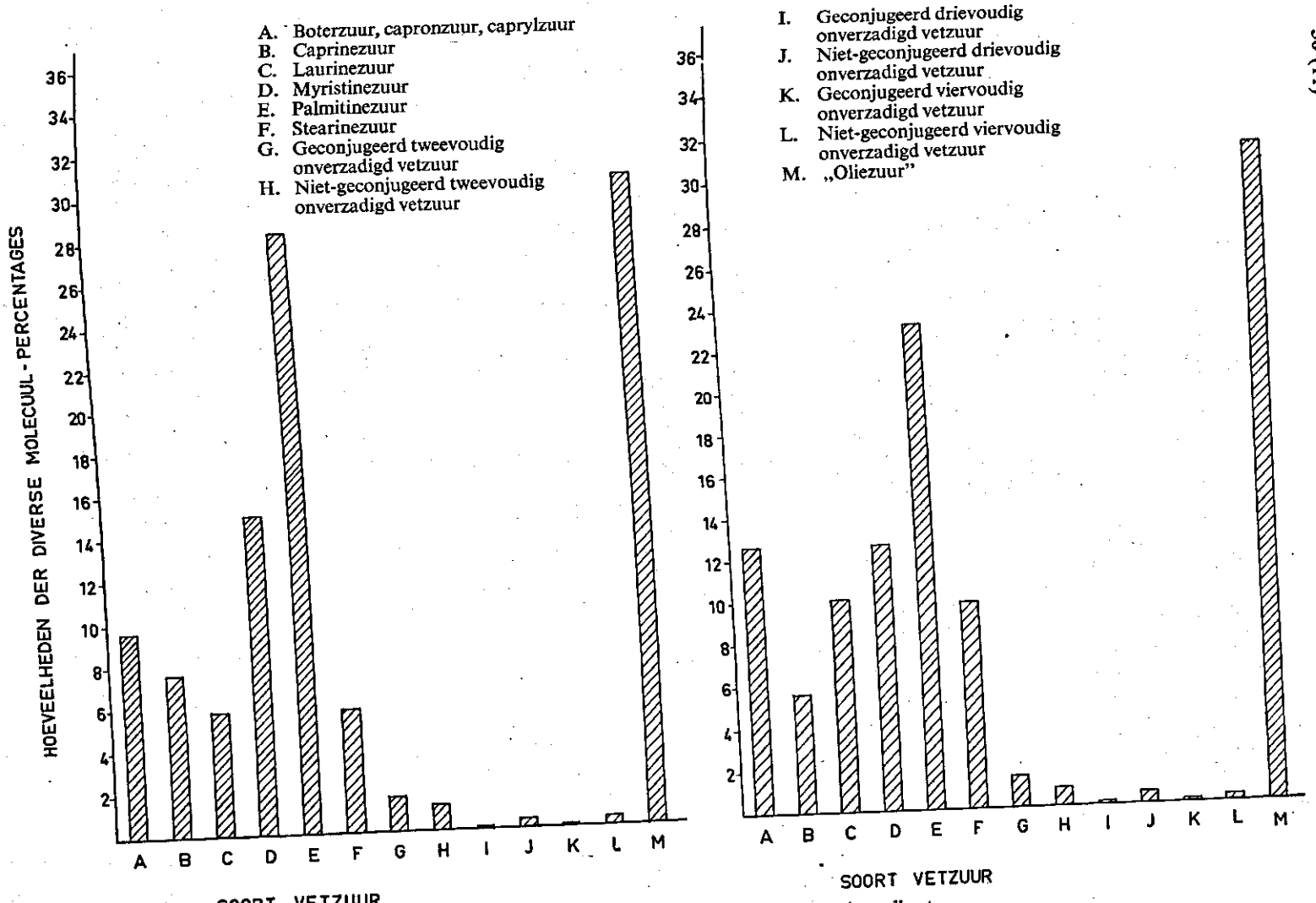

FIG. 10. De vrije vetzuren in kaasvet; de vetzuren in melkvet

1. HET PASTEURISEREN VAN DE KAASMELK

De invloed van het pasteuriseren van de kaasmelk is zeer groot. Op blz. 4 werd vermeld, dat zelfs bij een verhitting van de melk tot zulke betrekkelijk lage temperatuur, dat van pasteurisatie nog niet kan worden gesproken, een merkbare invloed op de vetsplitsing wordt uitgeoefend. Verder bleek, dat melklipase zeer gevoelig is voor verhitting. Hierin zal naar onze mening dan ook voor een belangrijk deel de oorzaak liggen van de verminderde vethydrolyse in kaas bereid uit gepasteuriseerde melk. De thermotolerantie van lipasen van de *Pseudomonas*-soorten en de *Achromobacteriaceae* werd niet uitvoerig bestudeerd. Enige oriënterende proeven wezen erop, dat deze lipasen waarschijnlijk thermotoleranter zijn dan melklipase. Ofschoon bij een verhitting van een half uur op 63 °C de bacteriën reeds waren gedood, was bij deze proeven het enzym althans zeker voor een deel nog werkzaam in de kaas. De vethydrolyse in kaas uit gepasteuriseerde melk, die meermalen werd waargenomen, zal dan ook waarschijnlijk voor een belangrijk deel veroorzaakt zijn door dit na de verhitting overblijvende deel der bacteriële lipasen. Ook de in de praktijk uit gepasteuriseerde melk bereide kazen vertonen soms een vrij sterke vethydrolyse. Misschien moet deze vethydrolyse aan dezelfde oorzaak worden toegeschreven.

2. DE INVLOED VAN HET GEWICHT EN DE VORM VAN DE KAAS

De invloed van het gewicht en de vorm van de kaas werd reeds uitvoerig besproken. Door lipasen afkomstig van de oppervlakteflora en waarschijnlijk ook door de structuurveranderingen veroorzaakt door het sterker uitdrogen van het oppervlak, worden in de rand van de kaas meer vetzuren gevormd dan in het inwendige. Deze vetzuren diffunderen langzaam naar binnen. In kleine kazen zal dit midden eerder bereikt zijn dan in grote kazen. Bovendien vinden de genoemde veranderingen tengevolge van het uitdrogen in kleine kazen relatief in sterkere omvang plaats. Dit zal tengevolge hebben dat in kleine kazen relatief sterkere stijgingen optreden dan in grote kazen. Uit de gegevens vermeld in tabel 2 en figuur 1 blijkt dit duidelijk.

3. DE INVLOED VAN DE pH VAN DE KAAS

De invloed van de pH dient nader verklaard te worden. RAADSVELD en MULDER (1949) toonden duidelijk aan, dat bij een lagere pH een grotere vetsplitsing optrad. Dit kon door ons worden bevestigd. Deze waarneming zou verklaard kunnen worden door te veronderstellen, dat de vetsplitsende enzymen bij lage pH een grotere activiteit hebben, maar ook door te veronderstellen, dat het kaasvet in de toestand waarin het in kaas voorkomt gemakkelijker wordt gehydrolyseerd bij lage pH dan bij hoge pH. Bij een onderzoek over de invloed van de pH op de activiteit der lipasen bleek, dat naarmate de pH lager werd de activiteit afnam. Voor melklipase is dit vermeld op blz. 12, voor bacteriële lipasen op blz. 46. De eerste veronderstelling werd dus door de proefnemingen weerlegd. Over de aantastbaarheid van vet in kaas met verschillende pH werd een proef verricht waarvan de resultaten misschien enig inzicht kunnen verschaffen.

Er werd 36 l melk gepasteuriseerd en daarna verdeeld in 2 porties. Na koelen tot stremtemperatuur werd aan beide porties 4 ml van een enzymextract van vetsplitsende bacteriën (stam 23a, Alcaligenes) toegevoegd. Hieruit werd kaas

bereid met een relatief hoge en een relatief lage pH. De bereidingswijze van dit extract is beschreven op blz. 45 e.v. Tabel 40 laat zien, dat door het toevoegen van een gelijke hoeveelheid enzymextract aan de kaasmelk in de daaruit bereide kaas bij een lage pH een sterkere vetsplitsing teweeg werd gebracht dan bij een hoge pH.

TABEL 40. *De inwerking van een steriel enzymextract op het vet in kaas bij verschillende pH*

Duur van de rijping	Kaas met lage pH			Kaas met hoge pH		
	pH	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas	pH	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
6 weken	5,13	2,2	goede kaassmaak	5,27	1,9	goede kaassmaak
26 weken	5,35	7,1	sterke kaassmaak; iets afwijkend	5,48	4,0	kaassmaak; onzuiver

Naar onze mening wijst deze proef erop, dat er wat de afbraak van vet in kaas betreft andere omstandigheden heersen dan dat bij de proeven omtrent de invloed van de pH op de activiteit der gevormde lipasen het geval was. Mogelijkerwijze is het vet in de toestand waarin het in kaas voorkomt bij een lage pH meer aantastbaar dan bij een hoge pH.

4. DE INVLOED VAN DE BEWARINGSTEMPERATUUR

Zoals bekend wordt de activiteit van enzymen o.a. door de incubatietemperatuur bepaald. Het is daarom logisch dat ook de temperatuur, waarbij de kazen worden bewaard, invloed uitoefent op de vethydrolyse. Bij de proeven beschreven op blz. 7 was in overeenstemming hiermee bij een bewaringstemperatuur van 16 °C het vet na 30 weken ongeveer twee maal zo sterk afgebroken dan bij een bewaringstemperatuur van 6 °C. Behalve op de activiteit van het enzym zal de temperatuur ook invloed hebben op de hoeveelheid vloeibaar vet. Deze hoeveelheid zal bij 16 °C en 6 °C verschillen. Wat de invloed is van deze verschillen in kristallisatietoestand dient nader te worden onderzocht.

5. HET VOORTSCHRIJDEN VAN DE VETSPLITSING

Bij de bespreking van de oorzaak der vethydrolyse in kaas bleek, dat de vetsplitsing zeker voor het grootste deel veroorzaakt werd door enzymen die vanaf het begin der kaasrijping aanwezig waren. Het zuurgetal in het inwendige van de kaas zal daarom in principe rechtlijnig met de tijd van rijpen verlopen. Aan het oppervlak van kaas wordt door de lipasen van de korstflora en door de structuurveranderingen tengevolge van het sterkere uitdrogen het vet sneller afgebroken. De gevormde vetzuren zullen naar binnen diffunderen en daar extra-stijgingen van het zuurgetal veroorzaken. De lijn die het verband aangeeft tussen de tijd en het zuurgetal, zal hierdoor na verloop van tijd naar boven buigen. Dit verschijnsel is geconstateerd bij kleine kazen. Bij grote kazen zal dit verschijnsel zich in belangrijk mindere mate uiten. In grote kazen loopt de stijging van het zuurgetal dan ook nagenoeg rechtlijnig met de tijd.

In kaas wordt tijdens de rijping slechts een klein deel van het vet afgebroken. De vrijgekomen vetzuren zullen dan ook niet zo gemakkelijk een remmend effect teweeg brengen. Alleen bij zeer sterke vetafbraak zal de genoemde lijn

enigszins vlak gaan lopen. Mogelijkerwijze wordt dit vlak lopen voor een deel gecompenseerd door de vetzuren die van het oppervlak naar het inwendige van de kaas diffunderen, zodat toch de indruk van een rechte lijn wordt verkregen.

HOOFDSTUK VIII

PRAKTIJKPROEVEN OVER DE VERBETERING VAN DE SMAAK VAN KAAS

In het voorgaande werd erop gewezen, dat vetzuren van belang zijn voor de smaak van kaas. Kaas uit rauwe melk kan onder meer door de aanwezigheid van vetzuren belangrijk beter van smaak zijn dan kaas uit gepasteuriseerde melk. In laatstgenoemde kaas worden tijdens de rijping nl. belangrijk minder vetzuren gevormd. Uit de beschreven proefnemingen bleek, dat de vetsplitsing in kaas uit rauwe melk waarschijnlijk veroorzaakt wordt door melklipase en lipasen afkomstig van bepaalde vethydrolyserende micro-organismen. Bovendien bleek, dat melklipase en de lipasen der micro-organismen het vet in kaas op nagenoeg gelijke wijze afbreken. Melklipase is moeilijk in zuivere toestand te verkrijgen en het is dus technisch zonder nader onderzoek niet mogelijk door het toevoegen van dit enzym aan gepasteuriseerde melk de vetsplitsing in de daaruit bereide kaas bewust te regelen. Het toevoegen van cultures van bepaalde vethydrolyserende micro-organismen aan gepasteuriseerde melk bracht in de daaruit bereide kaas een duidelijke vetsplitsing teweeg. Op blz. 44 zijn de resultaten van enige van dergelijke proefnemingen reeds vermeld. De vraag deed zich voor, of het door toevoeging van genoemde cultures mogelijk zou zijn behalve een verhoogde vethydrolyse ook smaakverbetering teweeg te brengen. Verhoging van de vethydrolyse en verbetering van de smaak zijn immers niet identiek. De moeilijkheid was de hoeveelheid der toegevoegde culture zo te regelen, dat de verhoogde vethydrolyse het evenwicht tussen verschillende smaakcomponenten verbeterde. Bij de laboratoriumproeven gelukte het op de genoemde wijze in kaas uit gepasteuriseerde melk smaakverbetering tot stand te brengen. Om na te gaan, of deze wijze van werken ook onder praktijkomstandigheden zou leiden tot kwaliteitsverbetering, werden in de kaasmakerij van de proeffabriek van het N.I.Z.O. te Ede enige proeven verricht. Ter oriëntering omtrent de activiteit van een toe te voegen culture werd telkens vier weken vóór de proef in de fabriek in het laboratorium kaas bereid uit kleine porties gepasteuriseerde melk, waaraan verschillende hoeveelheden der culture waren toegevoegd. Gestreefd werd naar een niet te grote doch goed merkbare vetsplitsing.

1. Methode

Bij elk van de proeven werd ± 4500 l melk na mengen en pasteuriseren verdeeld over twee kaasbakken. Tijdens het vullen van de kaasbakken werd de melk geënt met de benodigde hoeveelheid zuursel. Aan één van beide porties werd vóór het verkazen een naar aanleiding van bovengenoemde laboratoriumproeven bepaalde hoeveelheid van een culture van vetsplitsende bacteriën toegevoegd. Daarna werden beide porties melk op gelijke wijze tot kaas verwerkt.

Met behulp van trypton-tributyrine agar als voedingsbodem werd van de

geënte (A) en de niet-geënte (B) melk het aantal vethydrolyserende micro-organismen bepaald. Deze proef werd vier maal uitgevoerd, telkens met toevoeging van cultures van andere stammen.

2. Resultaten

Een overzicht van de uitkomsten van deze proefnemingen wordt gegeven in tabel 41.

Tabel 41. *Het toevoegen van cultures van vethydrolyserende bacterien aan gepasteuriseerde melk en de smaak van de daaruit bereide kaas*

Hoeveelheid verkaasde melk in l	Hoeveelheid toegevoegd culture in % v.d. melk	Genus	Aantal vetsplitsers per ml	Duur van de rijping	Zuurgetal van het vet	Smaak van de kaas
			Met toevoeging van vethydrolyserende bacteriën			
A 1) 2250	0,027	*Pseudomonas*	266000	2 weken	1,3	enige kaassmaak
				4 weken	1,5	enige kaassmaak
				10 weken	1,9	kaassmaak; nasmaak goed
2) 2275	0,050	*Alcaligenes*	710000	2 weken	1,8	goor; scherp
				4 weken	2,0	iets goor; iets bitter
				10 weken	2,5	ka ssmaak; nasmaak goed
3) 2275	0,040	*Alcaligenes*	410000	2 weken	1,8	kaassmaak; scherp
				4 weken	2,6	kaassmaak; nasmaak goed
				10 weken	3,3	sterke kaassmaak
4) 2200	0,006	*Achromobacter*	35000	2 weken	0,9	enige kaassmaak
				4 weken	1,2	enige kaassmaak
				10 weken	1,5	kaassmaak; vrij zuiver
			Zonder toevoeging			
B 1) 2275			130	2 weken	1,2	goed
				4 weken	1,3	iets bitter
				10 weken	1,5	iets bitter
2) 2250			20900	2 weken	1,3	goor
				4 weken	1,5	bitter; goor
				10 weken	1,7	zout; nasmaak bitter
3) 2250			1210	2 weken	1,2	goed
				4 weken	1,2	goed; iets bitter
				10 weken	1,2	goed; iets bitter
4) 2225			9800	2 weken	0,7	goed
				4 weken	0,9	goed
				10 weken	1,0	goed; iets zout; iets bitter

N.B. bij de 1e proef werd de melk niet vooraf gemengd.

Evenals bij de laboratoriumexperimenten werd bij deze op praktijkschaal genomen proeven gevonden, dat door het toevoegen van cultures van vetsplitsende micro-organismen de vetsplitsing kan worden bevorderd en dat een geschikte dosering van de culture tot smaakverbetering kan leiden.

SAMENVATTING

De kaas, die vroeger op de boerderij werd gemaakt is zeker pikanter van smaak geweest dan de kaas die tegenwoordig in de fabrieken wordt bereid. Hiervoor bestaan verschillende oorzaken. In de fabriek wordt veel meer dan vroeger op de boerderij aandacht besteed aan uniformiteit en hoge opbrengst,

terwijl de melk meestal wordt gepasteuriseerd. LANE en HAMMER (1939) vonden, dat de hydrolyse van het vet in kaas door het pasteuriseren van de kaasmelk belangrijk vermindert. MULDER (1952) vond hetzelfde voor Edammer en Goudse kaas. Omdat de vetzuren belangrijke smaakcomponenten van kaas zijn, was het de moeite waard na te gaan, welke enzymen in staat zijn het vet in kaas te hydrolyseren. Bovendien was het nodig te onderzoeken op welke wijze het vet in kaas door de enzymen werd afgebroken, een verklaring te geven voor de invloed op deze vetsplitsing van allerlei omstandigheden die zich bij de kaasbereiding en -bewaring voordoen en na te gaan in hoeverre een bewuste regeling van de vetsplitsing zou kunnen bijdragen tot kwaliteitsverbetering.

Als maat voor de vethydrolyse gebruikten wij het zuurgetal van het kaasvet d.i. het aantal ml 0,1 N. NaOH nodig voor het neutraliseren van 10 g vet (indicator: phenolphtaleïne). Bij onze proeven met kaas verkregen wij het kaasvet door gelijke gewichtsdelen gemalen kaas en fijn rivierzand tot een temperatuur van 45 °C te verwarmen en uit te persen. De smaak werd beoordeeld langs zintuiglijke weg.

Vetsplitsende enzymen voorkomende in kaas zouden afkomstig kunnen zijn van: het stremsel, van de melk en van micro-organismen.

In Nederlands handelsstremsel konden geen vetsplitsende enzymen aangetoond worden. Wanneer botervet langdurig met stremsel werd geschud, trad geen vethydrolyse op.

De echte melklipase draagt waarschijnlijk wel bij tot de vethydrolyse tijdens de kaasrijping. Immers, wanneer kaas werd bereid uit „aseptisch" gewonnen melk, waarin geen groot aantal vethydrolyserende bacteriën voorkwam, vertoonde zulke kaas nog altijd een belangrijke vethydrolyse. Ook kon in de met chloroform geconserveerde room, die verkregen was uit „aseptisch" gewonnen melk, bij een pH 5,0 en een zoutconcentratie van 5 %, een duidelijke vethydrolyse aangetoond worden. MULDER (1947) vermeldde, dat door het centrifugeren bij een betrekkelijk hoge temperatuur b.v. 30 °C de verkregen room (W-room) lagere melklipase-activiteit vertoonde dan de room verkregen door bij een tamelijk lage temperatuur b.v. 10 °C te centrifugeren (K-room). Bij het bepalen van de activiteit van melklipase in de ondermelk kon het omgekeerde geconstateerd worden. Wanneer kaas werd bereid uit een mengsel van K-room en W-ondermelk en uit een mengsel van W-room en K-ondermelk was de vetsplitsing het grootst in de kaas bereid uit het eerste mengsel. Bovendien werd door ons gevonden, dat door een korte verhitting van de kaasmelk op een zodanige temperatuur, dat van pasteuriseren nog niet kon worden gesproken, reeds een belangrijke invloed op de hydrolyse van het kaasvet tijdens de rijping werd uitgeoefend. Dit komt goed overeen met de geringe thermoresistentie van melklipase. De beschreven proefnemingen wijzen er op, dat melklipase zal kunnen bijdragen tot het hydrolyseren van het vet tijdens de kaasrijping.

Bij het bereiden van kaas uit mengsels van rauwe en gepasteuriseerde melk, werd waargenomen dat de hydrolyse van het vet van kaas bereid uit de mengsels hoger werd naarmate het percentage van de rauwe melk in het mengsel toenam. De hydrolyse in kaas bereid uit de mengsels was steeds lager dan in kaas bereid uit rauwe melk. Deze proeven laten zien, dat de lipasen die het vet in kaas afbreken, van het begin van het rijpingsproces af aanwezig zijn.

Behalve echte melklipase(n) kunnen ook bacteriële lipasen bijdragen tot de vetsplitsing.

Door het verschil in milieu mag men in de melk, waaruit de kaas bereid

wordt, in het inwendige van kaas en op het oppervlak van kaas drie onderscheiden microflora's verwachten.

In het inwendige van kaas is de soortenrijkdom en het aantal der vethydrolyserende bacteriën meestal laag. Dit is logisch want in harde kaassoorten zijn de groeimogelijkheden voor de meeste micro-organismen gering. Het aantal vetsplitsende bacteriën bleek in kaas zeer snel en plotseling af te nemen. De genera *Lactobacillus* en *Micrococcus* kunnen echter vaak nog van belegen kaas geïsoleerd worden. Ofschoon een deel van de geïsoleerde stammen van deze genera lipasen vormden, vertoonden deze enzymen bij een pH 5 en een zoutconcentratie van 5% nagenoeg geen activiteit. Wanneer een suspensie van een goede belegen kaas uit rauwe melk werd toegevoegd aan gepasteuriseerde kaasmelk, kon in de daaruit bereide kaas geen vethydrolyse worden aangetoond. Uit deze proeven valt af te leiden, dat in kaas levende vetsplitsers van geen belang zijn en dat er gedurende de rijping geen actief lipase wordt bijgevormd.

RAADSVELD en MULDER (1949) bewezen, dat het zuurgetal van het kaasvet tijdens de rijping nagenoeg rechtlijnig met de tijd van bewaren toeneemt. Deze waarneming en de bovenbeschreven rijping van kaas bereid uit verschillende mengsels van rauwe en gepasteuriseerde melk, geven aanleiding tot de veronderstelling, dat de actieve lipasen in ieder geval vanaf het begin van de rijping aanwezig zijn.

In kaas bereid van „aseptisch" gewonnen melk wordt het vet in mindere mate afgebroken dan in melk met een groot aantal vethydrolyserende bacteriën. Blijkbaar zijn lipasen van bacteriële oorsprong belangrijk. In de praktijk van het kaasbereiden heeft men de ervaring opgedaan, dat kaas bereid uit verse melk minder kaassmaak kan bezitten dan kaas bereid uit melk die voor de verwerking enige tijd bewaard werd. In de op de laatst genoemde wijze bereide kaas konden wij een snellere vetafbraak aantonen dan in kaas bereid uit verse melk. Zoals reeds hierboven werd vermeld, trad in jonge kaas bereid uit zonder speciale voorzorgen gewonnen melk een snelle en plotselinge afneming van het aantal vethydrolyserende bacteriën op. Deze waarnemingen brachten ons op de idee dat bepaalde vethydrolyserende bacteriën van rauwe melk verantwoordelijk waren voor de vetafbraak in kaas. Ofschoon deze micro-organismen reeds enige dagen na de bereiding niet meer uit kaas zijn te isoleren, scheiden zij in het medium voor of na autolyse een lipase af die actief is in kaas. Deze veronderstelling werd bewezen, toen door het toevoegen van cultures van vethydrolyserende bacteriën aan gepasteuriseerde melk de vethydrolyse in de daaruit bereide kaas toenam. De micro-organismen die in staat waren deze lipasen te produceren, behoorden in hoofdzaak tot de geslachten *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* en *Serratea*. Normaliter komen deze bacteriën met het melkmateriaal in de melk terecht. Bij het onderzoek van een aantal stammen van genoemde genera bleek ongeveer een vierde deel daarvan een lipase te produceren, die bij een pH 5 en een zoutconcentratie van 5% werkzaam kon zijn. Wanneer steriele extracten van gedroogde bacteriën aan gepasteuriseerde melk werden toegevoegd, kon in de daaruit bereide kaas een aanmerkelijke vethydrolyse teweeggebracht worden. De enzymen zijn dus onafhankelijk van de levende cellen werkzaam. Uitgaande van deze gedachtengang valt het gemakkelijk te begrijpen, waarom bij het bestuderen van het kaasrijpingsproces zo weinig vorderingen gemaakt konden worden door te trachten micro-organismen uit kaas te isoleren.

Bij ons onderzoek werd waargenomen, dat het vet in de rand van kaas belangrijk sterker werd afgebroken dan in het inwendige van de kaas. Het verschil in

zuurgetal tussen rand- en middengedeelte van kaas uit hoog-gepasteuriseerde melk verdween, als het oppervlak van kaas steriel gehouden werd. Het bleek, dat bepaalde vethydrolyserende micro-organismen op het kaasoppervlak voorkwamen die in staat waren het vet in de rand af te breken. Schimmels en bepaalde gisten (*Candida*) bleken de actieve micro-organismen te zijn. Bij kaas uit rauwe melk is het probleem enigszins gecompliceerder, omdat hier naast de invloed van de microflora nog een andere invloed moet zijn, die het zuurgetal van het randgedeelte relatief sterker doet oplopen. Deze tweede oorzaak schijnt samen te hangen met een relatief sterker uitdrogen van het randgedeelte van de kaas.

Bij een studie over de vethydrolyse in kaas is het van belang te weten, wat de samenstelling is van het mengsel der vrije vetzuren in gerijpte kaas en de samenstelling van dit mengsel te vergelijken met de vetzuursamenstelling van het oorspronkelijke melkvet. Een spectrofotometrische en een chromatografische methode werden toegepast om resp. de meervoudig onverzadigde en de verzadigde vetzuren te bepalen. In alle onderzochte gevallen bleken de vrije lagere vetzuren een nagenoeg gelijk deel te vormen van het gehele mengsel van de vrije vetzuren van het kaasvet. Het zuurgetal van het kaasvet is daarom een bruikbare maat voor de vrije lagere vetzuren, die immers voor de kaassmaak de belangrijkste van de uit vet gevormde vetzuren zijn. Bovendien werd gevonden, dat bij de vethydrolyse tijdens de kaasrijping geen vetzuren bij voorkeur worden afgesplitst. De gemengde triglyceriden worden volledig afgebroken. Ook bleken bacteriële lipasen en melklipase het kaasvet op nagenoeg gelijke wijze af te breken. Wanneer de rijping van kaas uit gepasteuriseerde melk, waaraan een culture van bepaalde vethydrolyserende bacteriën was toegevoegd, werd vergeleken met kaas uit „aseptisch" gewonnen melk, bleek tussen de mengsels der vrije vetzuren in het kaasvet geen belangrijk verschil in samenstelling te bestaan. Voor de kaassmaak maakt het dus geen verschil, of melklipase of bacteriële lipasen het vet hydrolyseren.

Zoals reeds werd vermeld, heeft het pasteuriseren van kaasmelk een belangrijke invloed op de hydrolyse van het vet tijdens de rijping. Deze invloed hangt samen met de geringe bestendigheid van melklipase tegen hoge temperaturen. Bacteriële lipasen schijnen thermoresistenter te zijn. Waarschijnlijk moet de vethydrolyse die wordt geconstateerd in kaas bereid uit gepasteuriseerde melk, toegeschreven worden aan de rest die van de bacteriële lipasen na de verhitting overblijft.

Zoals reeds door RAADSVELD en MULDER (1949) werd gevonden trad in kaas met een lage pH een sterkere vethydrolyse op dan in kaas met een hoge pH. Door ons werd gevonden dat bacteriële lipasen minder actief zijn naarmate de pH lager is. Wanneer echter dezelfde hoeveelheid van een steriel extract van actieve vethydrolyserende micro-organismen aan twee porties gepasteuriseerde melk werd toegevoegd, nam het zuurgetal van het vet van de daaruit bereide kaas meer toe in de kaas met een lage pH dan in de kaas met een hoge pH.

RAADSVELD en MULDER (1949) namen waar, dat bij een lage bewaringstemperatuur de hydrolyse van het kaasvet wordt vertraagd. Dit wordt duidelijk als we bedenken, dat enzymatische reacties op dezelfde wijze door veranderingen in temperatuur worden beïnvloed als chemische reacties.

Het gewicht en de vorm van de kaas hebben invloed op de vethydrolyse. In relatief kleine kazen werd geen rechtlijnig verband gevonden tussen de tijd van rijpen en het zuurgetal. In deze kazen traden relatief sterkere stijgingen op. Om-

dat kleine kazen een relatief groter oppervlak hebben dan grote kazen zullen de sterkere stijgingen van het zuurgetal in dit randgedeelte op het zuurgetal van het vet van een gemiddeld monster meer invloed uitoefenen.

Hiervoor werd reeds vermeld, dat het mogelijk is door toevoegen van bepaalde cultures van vethydrolyserende bacteriën aan gepasteuriseerde melk in de daaruit bereide kaas de vethydrolyse te verhogen. Bij een aantal proefnemingen op kleine schaal bleek, dat bij een bepaalde dosering ook smaakverbetering teweeggebracht kon worden. Het was dus de moeite waard om na te gaan, of deze vinding enige waarde had voor de praktijk. In de proeffabriek van het N.I.Z.O. te Ede werd daarom onder praktische omstandigheden kaas bereid uit gepasteuriseerde melk waaraan cultures van vethydrolyserende bacteriën waren toegevoegd. Door deze toevoegingen kon in de kaas smaakverbetering teweeggebracht worden.

SUMMARY

The cheese formerly prepared on the farm certainly had a more piquant flavour than the present day factory made cheese. Several reasons can be mentioned for it. In the factory uniformity and yield receive much attention. Furthermore in the factory cheese is mostly prepared from pasteurised milk. As LANE and HAMMER (1939) showed, pasteurisation of the milk retards in an important degree the hydrolysing of the cheese fat which occurs during the ripening of Cheddar cheese. The same was reported by MULDER (1947) for Edam and Gouda cheese. Fatty acids are important flavour constituents in cheese. Therefore it was considered worth while to determine:

1. the enzymes which are able to split the fat in cheese.
2. the way in which the fat in cheese is broken down by the enzymes.
3. the nature of some factors controlling the hydrolysis of cheese fat.
4. and to control flavour by regulating the hydrolysis of cheese fat.

As a measure for fat hydrolysis the acidity of the fat was used i.e. ml of 0,1 n NaOH, required for neutralisation of 10 g of fat (indicator: phenolphtaleïn).

The cheese fat was obtained by pressing a mixture of equal parts by weight of ground cheese and fine river sand at a temperature of 45 °C. The flavour of the cheese was judged organoleptically. In experiments with cream the fat was obtained by churning the cream, melting the butter and separating and filtering the butter fat.

No lipolytic enzymes can be detected in rennet as used in Dutch cheese making; the acidity of butter fat was not increased by shaking it for several days with a commercial Dutch rennet.

The original milklipase probably effects to some extent the fat hydrolysis in cheese as in cheese prepared from a low count milk i.e. a very low count of fat hydrolysing bacteria, the hydrolysis of fat was reduced but remained considerable. Furthermore in samples of cream prepared from a low count milk and prevented from microbiological deterioration by chloroform (conc.: 5 %) action of this enzym at a pH 5 and a salt concentration of 5 % i.e. at normal conditions of hard cheeses, was shown. As reported by MULDER (1947) separating milk at a rather high temperature (e.g. 30 °C) the cream obtained shows a lower milklipase-activity than the cream obtained by separating at a rather low temperature (e.g. 10 °C). Estimating the milklipase activity in the two sorts of

skimmilk the reverse was demonstrated. The cheese prepared from a mixture of the cream and the skimmilk both with the higher milklipase-activity showed also a higher hydrolysis of cheese fat in comparation with the cheese prepared from a mixture of the cream and the skimmilk both with the lower milklipase activity. Moreover a short heating at 55 °C of the milk intended for cheese-making was found to effect clearly the hydrolysis of the cheese fat. This agrees well with the low thermoresistance of milklipase. From these experiments it is highly probably that milklipase hydrolyses cheese fat to some extent.

Preparing cheese from raw milk and various mixtures of raw and pasteurised milk, it was demonstrated that the hydrolysis of the fat in cheese prepared from the mixture was higher in proportion, as the percentages of raw milk in the mixture increased. The hydrolysis was invariably inferior to the cheese prepared from the raw milk alone. These experiments lead us to believe that the active lipases are present from the beginning of the cheese ripening. This might be explained by assuming milklipase was the only cause of the hydrolysis of cheese fat. Other experiments, however, mentioned below, show the effect of micro-biological lipases in cheese.

In this respect 3 microflora's can be distinguished: the bacteria of the interior of the cheese, the micro-organisms of the milk intended for cheesemaking and the microflora of the surface of the cheese. Fat hydrolysing bacteria don't occur in the interior of the cheese in great varieties or in large numbers. This is logical as in hard cheeses the growth of most micro-organisms is strongly retarded. From the estimations of the count of lipolytic micro-organisms in milk and young cheese a rapid decrease of the count occurred. The genera *Lactobacillus* and *Micrococcus* normally are found in ripened cheese. Though some of these isolated strains produce lipases, none of these enzymes were able to hydrolyse fat to a measurable extent at pH 5 and a salt concentration of 5 %. When we added to pasteurised milk a suspension of a good cheese, prepared from raw milk, no hydrolysis of the fat of the cheese prepared from it was effected. From these experiments the absence of any formation of active lipase during the ripening process was established.

As pointed out by RAADSVELD and MULDER (1949) the acidity of the cheese fat increases directly with the age of the cheese. This observation and the ripening of cheese prepared from various mixtures of raw and pasteurised milk give rise to the conclusion that the active lipases are in any case present from the beginning of the ripening. In cheese prepared from a low count milk the fat is decomposed to a lower degree than in cheese prepared from a high count milk. Evidently we have to do with bacterial lipases. In the practice of cheese-making it is a well-known experience, that the flavour of cheese prepared from fresh milk is often inferior to the quality of cheese prepared from milk preserved for some time. In our experiments the latter cheese showed a higher fat break-down than the cheese prepared from fresh milk. In young cheese usually a rapid decrease of the fat-hydrolysing bacteria count was observed. These results suggested, that some of these bacteria are responsible for the fat breakdown in cheese. Although these organisms cannot be isolated from the cheese a few days after the preparation, some of them produce in the medium of release after autolysis a lipase, which is active in cheese. This supposition was proved by the increase of fat breakdown in cheese prepared from pasteurised milk, to which cultures of fat hydrolysing bacteria were added. These micro-organisms mainly belong to the genera *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* and *Serratia*.

Milk is normally infected with these organisms by the milk handling equipment. When investigating a number of these strains, about one quarter of them appeared to produce a lipase active at pH 5 and a salt concentration of 5%.

When adding cell-free extracts from dried bacteria to pasteurised milk a considerable hydrolysis of fat in the cheese prepared from it was effected. Consequently the enzymes work independently of the living cells. With this fact in mind it is easy to understand why earlier studies failed to associate many of the events in cheeseripening with specific bacteria.

In the investigations it was found that the fat occurring in the outer layer of the cheese was hydrolysed to a higher degree than the fat present in the interior of the cheese. In the case of cheese made from pasteurised milk this difference in fat hydrolysis disappeared, when the surface of the cheese was kept sterile. It appeared that lipolytic micro-organisms on the surface of the cheese, as moulds and some genera of yeasts (*Candida*), were responsible for the mentioned difference. With cheese of raw milk the problem is more complicated as great losses of moisture from the outer layer change the structure of the cheese. At the same time the conditions for rapid fat hydrolysis were promoted.

When investigating the fat breakdown during cheese ripening it is important to study the composition of the mixture of the free fatty acids from matured cheese and to compare this mixture with the fatty acid composition of the original milk fat. A spectrophotometric and a chromatographic method were applied to estimate the poly-unsaturated, the saturated fatty acids respectively. The lower free fatty acids, which are important flavour constituents, were found to constitute in the investigated cases routinely a standard proportion of the whole mixture of the free fatty acids. Therefore the acidity of cheese fat can be considered as a useful estimate for the lower free fatty acids in cheese fat. Furthermore it was found that generally speaking, in hydrolysis there is no evident priority for the lower fatty acids. The mixed triglycerides are completely hydrolysed. When preparing cheese from a low count milk and from pasteurised milk, to which cultures of the above mentioned micro-organisms were added, no great discrepancy appeared between the mixtures of the free fatty acids in the matured cheeses. Therefore milklipase and bacterial lipases hydrolysed the cheese fat in the same way.

As already indicated the pasteurisation of milk intended for cheese making affects the hydrolysis of cheese fat. This to a large extent is accounted for by the low thermoresistance of milklipase. Bacterial lipases seem to be more thermoresistent. It is emphasized, that the slow hydrolysis of fat in cheese prepared from pasteurised milk may be effected by the remaining part of the bacterial lipases. As reported by RAADSVELD and MULDER (1949) the hydrolysis of fat was found to take place more quickly in cheese with a low pH than in cheese with a high pH. When adding the same quantity of a cell-free extract from active lipolytic organisms with a lower activity at a lower pH to two portions of pasteurised milk, the acidity of the fat of the prepared cheese increased more in the cheese with a lower pH than in the cheese with a higher pH. Evidently the fat in a cheese with a lower pH is attacked more readily by lipases.

RAADSVELD and MULDER (1949) observed that a lower storage temperature retards the hydrolysis of fat. This is obvious as enzyme reactions are affected by change in temperature in the same way as chemical reactions.

The size and weight of cheese effect the rate of hydrolysis of cheese fat. In a smaller cheese no linear relationship between the acidity of cheese fat and the

time was found. In these cheeses relatively higher increases could be observed. Indeed also in a smaller cheese there is active lipase from the beginning resulting in an increase of the acidity of fat practically linear with time. The larger surface of a smaller cheese, however, effect an excess of the acidity of the cheese fat.

As mentioned above, it was possible to increase the hydrolysis of fat in cheese prepared from pasteurised milk by adding cultures of specified micro-organisms. As appeared from experiments on a small scale, the flavour of the cheese could be improved by a right dosing. It was worth while to find out, if these experiences had some practical value. Therefore in the experimental factory of the N.I.Z.O. (Netherlands Institute for Dairy Research) at Ede, the hydrolysis of the cheese fat was regulated by adding to pasteurised milk a dose of a culture of the specified micro-organisms established before with the help of the results of the laboratory experiments. These additions appeared to improve the flavour of the cheese.

LITERATUUR

1. Abd-el-Malek, Y. & Gibson, F. J., Dairy Res. **19** (1952) 294.
2. Abd-el-Malek, Y. & Gibson, F. J., Dairy Res. **15** (1948) 249.
3. Albert, J. O., Long, H. F. & Hammer, B. W., Ia. Agr. Exp. Sta. Res. Bul. **328** (1944).
4. Alford, J. A. & Frazier, W. C., J. Dairy Sci. **33** (1950) 107.
5. Alford, J. A. & Frazier, W. C., J. Dairy Sci. **33** (1950) 115.
6. Barthel, Chr., Sandberg, E. & Haglund, E., Le Lait **8** (1928) 285.
7. Bergey's Manual, 6th Edition, Baltimore, (1948).
8. Boekhout, F. W. J. & Ott de Vries, J. J., Versl. Proefzuivelboerderij Hoorn (1900) 5–39.
9. Boldingh, J., Rec. Trav. Chim. Pays Bas **69** (1950) 247.
10. Boldingh, J., Chem. Weekblad **48** (1952) 1.
11. Breed, F. A., New York State Agr. Exp. Sta. Techn. Bul. **132** (1928).
12. Brinkman, W., XIIIth Intern. Dairy Congress, The Hague, Section I, subj. **2** (1953) 121.
13. Burr, A. & Schlag, H., Molkerei Zeitung, Hildesheim **47** (1933) 85, 104.
14. Collins, M. A. & Hammer, B. W., J. Bact. **27** (1934) 473.
15. Cowan, S. F. & Shaw, Constance, J. Gen. Microbiol. 3 (1949) 69.
16. Dam, W. van, Versl. Landbouwk. Onderz. **33** (1928) 187.
17. Dommen, G., Landw. Jahrb. Schweiz **68** (1954) 297, Neue Folge: 3 Jahrgang.
18. Dorner, W., New York State Agr. Exp. Sta. Techn. Bul. **165** (1930).
19. Dorner, W., Allgemeine und Milchwirtschaftliche Microbiologie, Frauenfeld (1943) 196.
20. Drewes, K., Milchw. Forsch. **18** (1937) 289.
21. Evans, A. C., J. Inf. Dis. **18** (1916) 437.
22. Freudenreich, E. von, Landw. Jahrb. Schweiz **5** (1891) 16.
23. Galesloot, Th. E., Neth. Milk & Dairy J. **5** (1951) 75, 94.
24. Galesloot, Th. E., Neth. Milk & Dairy J. **6** (1952) 283.
25. Galesloot, Th. E., Neth. Milk & Dairy J. **7** (1953) 1, 15.
26. Galesloot, Th. E., Rapport bestemd voor de „Comm. Hyg. Prod. & Control of Milk" van de Intern. Zuivelb. (1954).
27. Gould, I. A., J. Dairy Sci. **24** (1951) 782.
28. Graber, H., Die Bedeutung der Euterinfektion und der Melkkontamination für die Keimzahl und die Haltbarkeit der Milch, Schaffhausen (1954).
29. Hammer, B. W., Dairy Bacteriology, 3rd Ed. New York (1948) 533.
30. Hansen, H. C., Hammer Panegyric (1937) 123.
31. Henrici's Molds, Yeasts and Actinomycetes, 2nd Ed., New York (1945) 81, 94.
32. Hiscox, E. R. & Harrison, J., J. Dairy Res. **9** (1938) 215.
33. Hiscox, E. R., Harrison, J. & Wolf, J. Z., J. Dairy Res. **9** (1938) 227.
34. Hiscox, E. R., Harrison, J. & Wolf, J. Z., J. Dairy Res. **12** (1941) 155.
35. Hucker, G. J., New York State Agr. Exp. Sta. Techn. Bul. **100** (1924).
36. Hucker, G. J., New York State Agr. Exp. Sta. Techn. Bul. **101** (1924).
37. Hugo, W. B., Bact. Rev. **18** (1954) 87.
38. Iya, K. K. & Frazier, W. C., J. Dairy Sci. **32** (1949) 475.

39. JENSEN, H. L., Proc. of Linnean Society of New South Wales **59** (1934) 19.
40. KAMER, J. VAN DE, PIKAAR, N. A., BOLSSENS-FRANKENA, A., COUVÉE-PLOEG, C. & GINKEL, L. VAN, Biochem. J. **61** (1955) 182.
41. KELLY, C. O. & MARGUARDT, J. C., J. Dairy Sci. **22** (1939) 309.
42. KOSIKOWSKY, F. V. & DAHLBERG, A. C., J. Dairy Sci. **29** (1946) 861.
43. KRUKOVSKY, V. N. & SHARP, P. F., J. Dairy Sci. **23** (1940) 1109.
44. LANE, C. B. & HAMMER, B. W., Ia. State Col. J. Sci. **13** (1939) 149.
45. LANGHUS, W. L., PRICE, W. V., SOMMER, H. H. & FRAZIER, W. C., J. Dairy Sci. **28** (1945) 827.
46. LEITCH, R. H., Scott. J. Agr. **17** (1934) 293.
47. LODDER, J. & KREGER-VAN RIJ, N. J. W., The Yeasts, A taxonomic study, A'dam (1952).
48. Manual of methods for pure culture study (1950–1953) Soc. Amer. Bact.
49. MULDER, H., Landbouwk. Tijdschr. **59** (1947) 181.
50. MULDER, H., Neth. Milk & Dairy J. **6** (1952) 157.
51. MULDER, H., Zuivelonderzoek, Den Haag, **1** (1947) 23.
52. Normaalblad N 1046–50, 26.
53. ORLA JENSEN, S., Landw. Jahrb. Schweiz **18** (1904) 314.
54. PETERSON, M. J. & JOHNSON, M. J., J. Bact. **58** (1949) 791.
55. PETERSON, M. J. & JOHNSON, M. J., J. Dairy Sci. **32** (1949) 862.
56. PETTE, J. W., Landbouwk. Tijdschr. **59** (1947) 175.
57. PETTE, J. W. & SJOLLEMA, P., Zuivelmicrobiologie en Melkhygiëne, 2e ed., Doetinchem (1951) 144.
58. PETTE, J. W., XIIIth Intern. Dairy Congress, The Hague, Sect. II, subj. **5**, (1953) 557.
59. PHILIPS, T. C. A. Department of the Main Industrial Group „Light". Special issue (1951).
60. PURKO, M., NELSON, W. O. & WOOD, W. A., J. Dairy Sci. **34** (1951) 699.
61. RAADSVELD, C. W. & MULDER, H., Neth. Milk & Dairy J. **3** (1949) 117.
62. RAADSVELD, C. W. & MULDER, H., Neth. Milk & Dairy J. **3** (1949) 222.
63. SANDELIN, E., Nordisk Mejeri-Tidsskrift **5** (1939) 102.
64. SANDS, MARY A. R., Penn. State Univ.. Thesis (1953).
65. SCHULZ, M. E., Milchwissenschaft **8** (1953) 17.
66. SHEURING, J. J. & TUCKEY, S. L., J. Dairy Sci. **30** (1947) 803.
67. STADHOUDERS, J. & MULDER, H., Neth. Milk & Dairy J. **9** (1955) 182.
68. STADHOUDERS, J. & MULDER, H., Neth. Milk & Dairy J. **10** (1956) 53.
69. STECK, W., Die latent Inf. der Milchdrüse, Hannover (1930).
70. STECK, W., Landw. Jahrb. Schweiz **35** (1921) 511, 629.
71. SHAW, CONSTANCE, STITT JENNIFER, M. & COWAN, S. T., J. Gen. Microbiol. **5** (1951) 1010.
72. SMILEY, K. L., KOSIKOVSKY, F. V. & DAHLBERG, A. C., J. Dairy Sci. **29** (1946) 307.
73. SMITH, G., An introduction to industrial mycology, 1st Ed., London (1938).
74. SUZUKI, S. K., Hastings, E. G. & HART, E. B., Wisc. Agr. Exp. Sta. Res. Bul. **11** (1910).
75. TAMMISTO, E. S., Untersuchungen über die Lipasen der Bacteriën, Diss., Helsinki (1933).
76. THOMAS, S. B., J. Dairy Sci. Abstr. **17** (1952) 2.
77. THOMÉ, K. E., Meddelande no. 11. från Statens Mejeriförsök (1942).
78. TITTSLER, R. P., J. Bact. **54** (1947) 12.
79. WILLIAMS, R. E., HIRCH, A. E. & COWAN, S. T., J. Gen. Microbiol. **8** (1953) 475.
80. WILSON, G. S., Med. Res. Council, Special Report no. 206, London (1935).
81. WILLSTÄTTER, R. & WALDSCHMIDT-LEITZ, E., Zeitschr. Physiol. Chem. **125** (1923) 131.
82. WILLSTÄTTER, R. & WALDSCHMIDT-LEITZ, E., Zeitschr. Physiol. Chem. **134** (1924) 161.
83. WINDISCH, K., Chem. Zentralblatt **72** (1901) 128.
84. WOLF, J., Proc. Soc. Agr. Bact. (Abstracts) (1941).
85. WOLFF, A., Milchwirtsch. Zbl. **5** (1909) 145.
86. WOLFF, A., Milchwirtsch. Zbl. **5** (1909) 414.
87. ZANT, W. C. VAN DER & NELSON, F. E., J. Dairy Sci. **37** (1954) 795.

STELLINGEN

I

In kaas bereid uit rauwe melk wordt het vet door melklipase gehydrolyseerd.

Dit proefschrift

II

Lipasen van sommige stammen der gramnegatieve bacteriën die in melk voorkomen, brengen in kaas vethydrolyse teweeg.

Dit proefschrift

III

Door de proeven van ALBRECHT en JAYNES wordt niet bewezen, dat er in koemelk van origine meer dan één vethydrolyserend enzym voorkomt.

ALBRECHT, T. W. & JAYNES, H. O.,
J. Dairy Sci. 38 (1955) 137.

IV

De werkwijze ter bereiding van kaas beschreven in octrooi-aanvrage no. 152193 van T.N.O. leidt niet tot verbetering van de smaak van het bereide product.

Octrooiraad, Nederland, Aanvrage no. 152193.

V

Het verdient aanbeveling maximum-grenzen vast te stellen voor het zoutgehalte van kaas.

VI

Het bepalen van het kiemgetal van gepasteuriseerde melk geeft geen indruk omtrent haar bacteriologisch kwaliteit.

VII

Het gebrek „laat los" van kaas kan niet alleen voorkomen worden door een juiste winning van de melk maar ook door een doeltreffende pasteurisatie en verwerkingswijze.

VIII

Door WILLIAMS is niet bewezen, dat alcoholisme een genetotrophische ziekte is.

WILLIAMS, R. J., Nutrition and Alcoholism.
University of Oklahoma, Press. Oklahoma, 1951.

IX

Bij de bereiding van zuivelproducten verdient het aanbeveling meer aandacht te besteden aan de smaak van deze producten dan dikwijls geschiedt.

X

Het bepalen van het caseïne-gehalte van melk met behulp van de methode KJELDAHL is in zekere mate willekeurig.

Proefschrift J. J. Stadhouders
Wageningen 1956