RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN

DE BEREIDING VAN AROMATISCHE BOTER

WITH A SUMMARY:

THE MANUFACTURING OF AROMATIC BUTTER

J. W. PETTE

STAATSDRUKKERIJ- EN UITGEVERIJBEDRIJF

VERSL. LANDBOUWK. ONDERZ. No. 53 9 C (427—470) - 'S-GRAVENHAGE - 1947

INHOUD

I. Inleiding 4

II. De aard van het zuursel 6

III. De invloed van zuurstof op de aromavorming 15

A. De afhankelijkheid van het diacetylgehalte van de hoeveelheid aanwezige zuurstof tijdens het zuren en het karnen . . 16

B. De vorming van diacetyl gedurende de bewaring van boter 26

IV. De invloed van technische maatregelen op het aroma. 32

A. De afkarningsgraad 32

B. Het wasschen van de boterkorrels 35

C. De invloed van het kneden der boter op het diacetylgehalte 37

V. Conclusies voor de practijk 38

Samenvatting 40

Summary: *The Manufacturing of aromatic Butter* 42

Literatuur 44

I. INLEIDING

Uit kwaliteitsoogpunt is het zeer gewenscht om aromatische boter te bereiden, omdat boter mede hierdoor haar groote waarde als spijsvet ontleent. De sterkte van het boteraroma wordt hoofdzakelijk bepaald door de hoeveelheid diacetyl, die de boter bevat. Diacetyl is niet de eenige geurstof in boter; er zijn ook andere stoffen in boter aanwezig b.v. azijnzuur, die voor het karakter van geur en smaak belangrijk zijn, doch naar onze meening is het diacetyl verreweg de belangrijkste en meest typeerende component van het boteraroma. Tallooze in dit artikel vermelde bepalingen van diacetyl bij aromatische en neutrale boters hebben dit zonder uitzondering bevestigd. Het is tevens de algemeen gangbare opvatting in de zuivelliteratuur.

Over de ontstaanswijze van het diacetyl in boter heerscht daarentegen geen eenstemmigheid, voornamelijk omdat niet met zekerheid te bewijzen is of melksuiker of citroenzuur de bron is, waaruit het diacetyl wordt gevormd. De aromabacteriën, die deze vorming volbrengen, ontplooien n.l. hun werkzaamheid slechts bij aanwezigheid van beide bovengenoemde voedselbronnen.

Onze opvatting is nog steeds die, welke neergelegd is in een publicatie in 1938, waarin citroenzuur als bron voor het diacetyl is beschouwd. (1). Wij werden hierin nog versterkt door het werk van BREWER en WERKMAN (2) en SLADE en WERKMAN (3), die aantoonden, dat suiker slechts een stimu leerende rol bij de citroenzuuromzetting vervult. Reeds bij een concentratie van glucose, gelijk aan 1/20 deel van die van het citraat, wordt dit laatste volledig omgezet. Zij wordt ook gesteund door de onderzoekingen van OVERBY (4), die evenals wij constateerde, dat na de volledige omzetting van het citroenzuur geen C_4-producten meer kunnen ontstaan. De door VIRTANEN en medewerkers (5) (5a) verdedigde stelling, dat suiker de bron is voor het diacetyl mist voldoende bewijskracht om onze opvatting te verlaten, in het bijzonder omdat bij de Finsche onderzoekingen geen diacetylbepalingen zijn verricht, maar de vorming van acetylmethylcarbinol als graadmeter voor de aromavorming is genomen.

Wij hebben onze theorie slechts als een werkhypothese beschouwd, om het practische doel, de regeling van het aroma aan boter, te bereiken. Wij hebben hierin duidelijk laten uitkomen, dat bij aanwezigheid van diacetyl wel is waar steeds carbinol gevonden wordt, maar niet omgekeerd en tevens *dat carbinol zeker niet het tusschenproduct is, waaruit het diacetyl ontstaat.*

Hoewel wij dit niet konden bewijzen, hebben wij aangenomen, dat het aceetaldehyde de intermediaire stof zou zijn, waaruit het diacetyl gevormd wordt, welke veronderstelling gesteund werd door het feit, dat VIRTANEN (6) ook aceetaldehyde in zuursels aantoonen kon.

Wanneer wij zekerheid hadden omtrent de aard van de stof, waaruit diacetyl rechtstreeks gevormd wordt, dan was het probleem misschien gemakkelijker op te lossen. Ondanks het feit, dat onze aandacht hierop voortdurend gericht is geweest en wij ook tal van proeven hierover hebben genomen, is het ons echter niet gelukt hierover zekerheid te verkrijgen.

[1] Manuscript ingezonden op 23 December 1946.

Intusschen werd onze opvatting dat pyrodruivenzuur een belangrijke tusschenstof is, door verscheidene onderzoekers bevestigd (2) (7) (8). Tevens werd waarschijnlijk gemaakt, dat het pyrodruivenzuur voorafgegaan wordt door oxaalazijnzuur.

STORGÅRDS (8), die een uitgebreid onderzoek verrichtte, toonde aan, dat Ca-ionen voor de vorming van het aroma noodzakelijk zijn en slaagde er in bij de omzetting van pyrodruivenzuur in neutraal milieu de vorming van aethylalcohol en azijnzuur te bewijzen, hetgeen in overeenstemming is met onze theorie. Daarentegen gelukte het aan hem nimmer om acetaldehyde aan te toonen en werd dus verondersteld dat het carbinol rechtstreeks uit pyrodruivenzuur gevormd wordt.

Hoewel dus de wijze van vorming van het diacetyl nog geenszins vaststaat, bleek het toch mogelijk met behulp van onze werkhypothese practische middelen te vinden voor de regeling van het aroma.

In dit artikel geven wij daarom, aanknoopende aan onze vroegere onderzoekingen, de werkwijze aan volgens welke het in de practijk mogelijk is aromatische boter te bereiden.

Als factoren, die van groote invloed zijn op de aromavorming kunnen genoemd worden:

1°. De aard van het bij de roomzuring gebruikte zuursel.
2°. De luchtzuurstof.
3°. De techniek van de bereiding, in het bijzonder de wijze van afkarnen.

Achtereenvolgens zullen we deze factoren bespreken aan de hand van de door ons genomen proeven, om ten slotte kort samen te vatten hoe men het aroma naar wensch kan regelen.

Hierbij is het misschien dienstig om op te merken dat het onderzoek betrekking heeft op de aromavorming in *gezuurde, doch niet gezouten boter.*

II. DE AARD VAN HET ZUURSEL

Reeds meermalen hebben we er op gewezen dat het bij de boterbereiding gebruikte zuursel een tweeledige werkzaamheid bezit. Het beïnvloedt zoowel de zuring als de aromavorming en men kan een zuursel dus slechts goed noemen indien het in beide opzichten voortreffelijk werkt. Dat wij ons in dit artikel speciaal met de aromavorming bezig houden, wil dus niet zeggen, dat wij de zuring minder belangrijk achten. Voor deze keer richten we onze aandacht echter speciaal op het feit, dat het zuursel ons de aromabacteriën verschaft, die voor de boteraromavorming verantwoordelijk zijn.

Deze aromabacteriën zijn eigenlijk een soort melkzuurbacteriën, die slechts weinig melkzuur vormen, doch daarnaast in staat zijn het in de melk voorkomende citroenzuur om te zetten in de voor het aroma belangrijke stoffen.

Volgens de indeeling van ORLA JENSEN worden zij betiteld met de naam *Betacoccus cremoris*, terwijl zij volgens BERGEY'S MANUAL gerekend worden tot het geslacht *Leuconostoc* en de naam dragen van *Leuconostoc citrovorus*.

Deze aromabacteriën nu, die in het zuursel in een soort symbiose of althans in een zeker evenwicht met de snelzurende melkzuurbacteriën *Sc. lactis* en *Sc. cremoris* leven, bezitten behalve hun aromavormende eigenschappen ook de eigenschap het gevormde diacetyl meer of minder sterk te kunnen reduceeren tot de reukelooze verbindingen acetylmethylcarbinol en butyleenglycol volgens de vergelijking:

$$\underset{\text{diacetyl}}{CH_3.CO.CO.CH_3} + 2H \rightarrow \underset{\text{acetylmethylcarbinol}}{CH_3.CHOH.CO.CH_3} + 2H \rightarrow \underset{\text{butyleenglycol.}}{CH_3.CHOH.CHOH.CH_3}$$

Het is in hoofdzaak deze eigenschap die de waarde van de aromabacteriën voor de aromavorming bepaalt. Hoe sterker de reduceerende eigenschappen van de aromabacteriën in het zuursel zijn, des te geringer is de kans om een goede aromavorming in zuursel, room of boter te verkrijgen.

Elders (9) gaven wij de voorwaarden, waaraan een goed aromatisch zuursel moet voldoen, nauwkeurig aan en wij ontwierpen een eenvoudige proef, de z.g. kreatineproef, waarmede men het aromatisch vermogen van het zuursel kan controleeren. Deze kreatineproef geeft aan hoe snel het carbinol tot

TABEL 1 Enting ½ % zuursel H bij 21° C.

Aantal uren na enting	mg per kg			
	Diac.	A.M.C.	B.G.	C_4-stoffen
42	1,15	88	94	183
66	1,15	97	89	187
112	1,0	97	89	187
12 dagen *days*	1,05	72	111	184
Number of hours after inoculation	*Diacetyl*	*Acetylmethylcarbinol*	*Butyleneglycol*	*C_4-compounds*

TABLE 1 *Inoculation with ½ % starter H at a temperature of 21° C.*

TABEL 2 Enting ½ % zuursel G bij 21° C.

Aantal uren na enting	mg per kg			
	Diac.	A.M.C.	B.G.	C_4-stoffen
42	1,3	63	114	178
66	0,6	5	165	171
90	0,2	4	176	180
Number of hours after inoculation	*Diacetyl*	*Acetylmethyl-carbinol*	*Butyleneglycol*	*C_4-compounds*

TABLE 2 *Inoculation with ½ % starter G at a temperature of 21° C.*

TABEL 3 Enting ½ % zuursel G bij 21° C. Na 65 uur werd 5 mg diacetyl per kg toegevoegd

Aantal uren na enting	mg per kg			
	Diac.	A.M.C.	B.G.	C_4-stoffen
22	1,7	166	68	234
41	1,2	41	185	226
65	0,45	9	219	228
65	5,4			
94	1,0	14	234	248
113	0,65	12	208	220
Number of hours after inoculation	*Diacetyl*	*Acetylmethyl-carbinol*	*Butyleneglycol*	*C_4-compounds*

TABLE 3 *Inoculation with ½ % starter G at a temperature of 21° C. After 65 hours 5 mg of diacetyl per kg is added.*

butyleenglycol wordt gereduceerd. Aangenomen werd dat indien er reductie van het carbinol optrad, ook het diacetyl zou worden gereduceerd, m.a.w. dat de reductie van het diacetyl parallel verloopt met die van het carbinol.

Dit is nu intusschen nog eens nagegaan. De tabellen 1, 2 en 3 geven hiervan een overzicht.

Het is uit deze cijfers duidelijk, dat bij het zwak reduceerende zuursel H (tabel 1) noch het diacetyl, noch het carbinol gereduceerd wordt, terwijl bij het sterk reduceerende zuursel G reductie van beide stoffen optreedt. Extra toegevoegd diacetyl (tabel 3) wordt ook snel gereduceerd. Bij de reductie ontstaat butyleenglycol, hoofdzakelijk uit het carbinol en slechts voor een gering deel uit diacetyl, doordat dit in verhouding tot carbinol in een klein percentage aanwezig is. De hoeveelheid C_4-stoffen wordt dan ook hoofdzakelijk bepaald door de hoeveelheid carbinol + glycol. Zij is, daar de bepalingen verricht werden na volledige omzetting van het citroenzuur nagenoeg constant. De gevonden waarden zijn grafisch uitgezet in fig. 1.

Fig. 1. Gelijkverloopende reductie van diacetyl en acetylmethylcarbinol in zuursels.
×—× diacetyl × 50.
△—△ ac. meth. carbinol.
□—□ but. glycol
↓ diacetyl toegevoegd.

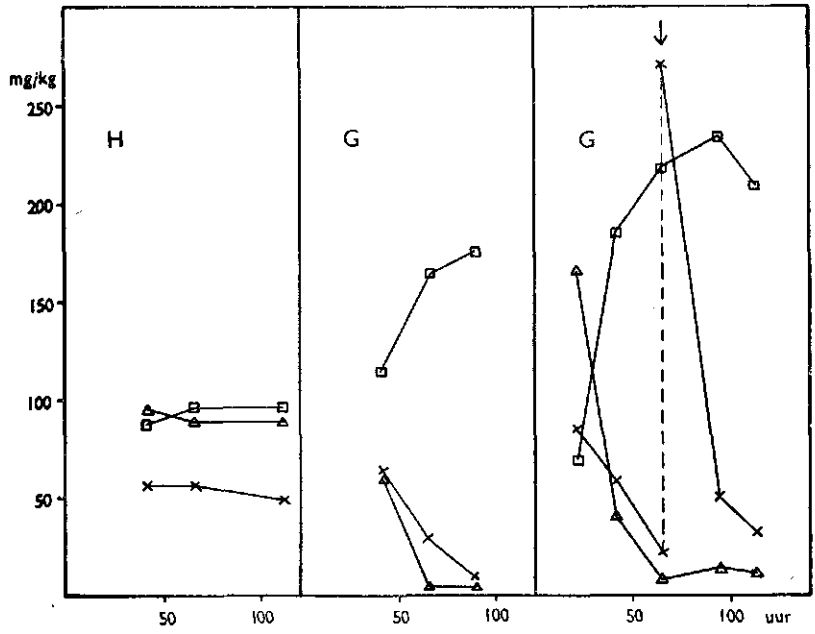


Fig. 1. Parallel progress of reduction of diacetyl and acetylmethylcarbinol in starters.
×—× *diacetyl × 50.*
△—△ *ac. meth. carb.*
□—□ *but. glycol.*
↓ *diacetyl added.*

De reductie van carbinol en diacetyl verloopt dus inderdaad parallel en we mogen dus de uitslag der kreatineproef ook van groote waarde voor de bestendigheid van het diacetyl in zuursels achten.

Daar ons bij de vroegere onderzoekingen was gebleken, dat de meeste in Nederland gebruikelijke zuursels sterk reduceerende aromabacteriën bevatten, spraken wij de verwachting uit, dat hiermede nimmer aromatische boter zou zijn te bereiden. Dit diende echter eerst nog bewezen te worden.

De vraag, die gesteld moest worden was dus deze. Is de reductieactiviteit van het zuursel ook nog van invloed op het diacetyl in de reeds gevormde boter, zoodat het aroma in met sterk reduceerende zuursels bereide boter niet tot ontwikkeling kan komen?

Om dit na te gaan hebben we in de loop der jaren 1942 en 1943 een aantal parallelproeven genomen in het laboratorium en de boterfabriek van de Proefzuivelboerderij, waarbij room verdeeld werd in 2 porties, welke respectievelijk gezuurd werden met aromatisch zuursel (zwak reduceerend, kreatinereactie 3 × positief) en sterk reduceerend zuursel (kreatinereactie op de 2e dag reeds negatief). Als aromatische zuursels werden gebruikt de practijkzuursels H, W

en H I en de zelf samengestelde zuursels 110A en D I. Als sterk reduceerende zuursels werden gebruikt de practijkzuursels G, O, Z, S en B en het zelf samengestelde zuursel 110.

De boters werden na de bereiding 1 week op 13° C geplaatst, waarna de sterkte van het aroma door 3 personen werd gewaardeerd en het diacetylgehalte werd bepaald volgens de methode van PRILL en HAMMER (10). Ook in de versche boter werd het diacetylgehalte bepaald.

Met weglating van alle bijzonderheden betreffende de bereidingswijze geven de tabellen 4 en 5 het resultaat van alle 22 genomen parallelproeven.

TABEL 4 Parallelproeven, genomen in het laboratorium.

Proef N°.	Datum	Zwak reducee-rend zuursel	Boter				Sterk reducee-rend zuursel	Boter			
			Versch	Na 1 week bij 13° C.				Versch	Na 1 week bij 13° C.		
			Diac. mg/kg		Geur *	Smaak *		Diac. mg/kg		Geur *	Smaak *
1	10/6 '42	H	0,8	1,1	ar	ar	G	0,95	0,5	n	n
2	17/9 '42	H	0,85	1,25	ar	ar	G	0,85	0,45	n	n
3	22/9 '42	D I	0,85	1,95	b. ar	b. ar	G	0,9	0,6	n	n
4	24/9 '42	110A	0,9	2,6	ar	b. ar	G	0,85	0,45	n	n
5	8/10 '42	D I	0,75	1,4	ar	ar	B	0,60	0,55	n	n
6	17/2 '44	H	1,0	1,8	ar	ar	110	0,9	0,45	n	n
Gemiddeld *Average*		.	0,86	1,68	.	.	.	0,84	0,50	.	.
Experiment N°.	*Date*	*Weakly reducing starter (aromatic)*	*Diac. mg/kg*		*Odour* *	*Taste* *	*Strongly reducing starter*	*Diac. mg/kg*		*Odour* *	*Taste* *
			Fresh	*After 1 week at 13° C.*				*Fresh*	*After 1 week at 13° C.*		
			Butter					*Butter*			

TABLE 4 *Parallel laboratory experiments.*

* De waardeering voor geur en smaak betreft het gemiddelde oordeel van de 3 personen, die de keuring verrichtten. Hierbij beteekent:

The odour and the taste of the butter were examined by 3 judges, the average opinions of whom were taken as standardqualifications :

b. ar = best aroma
ar = goed aroma (*good aroma*)
z.a = zwak, maar duidelijk aroma (*weak but distinct aroma*).
z.z.a. = zeer zwak aroma, twijfelachtig (*very weak aroma, doubtful*).
n. = neutraal, geen aroma (*neutral, no aroma*).

Het resultaat der genomen proeven is buitengewoon duidelijk. In alle gevallen, waarbij met zwak reduceerende zuursels boter bereid werd, werd duidelijk aroma waargenomen. In alle gevallen, waarbij de boter met sterk reduceerend zuursel werd gemaakt, ontstond geen aroma, met uitzondering van proef N°. 14 in tabel 5. Het sterk reduceerende zuursel Z gedroeg zich

TABEL 5 Parallel proeven, genomen in de boterfabriek van de Proefzuivelboerderij.

Proef N°.	Datum	Zwak reduceerend zuursel (aromatisch)	Kreatine-proef *	Boter: Versch Diac. mg/kg	Boter: Na 1 week bij 13° C. Diac. mg/kg	Boter: Na 1 week bij 13° C. Geur	Boter: Na 1 week bij 13° C. Smaak	Sterk reduceerend zuursel	Kreat.-proef *	Boter: Versch Diac. mg/kg	Boter: Na 1 week bij 13° C. Diac. mg/kg	Boter: Na 1 week bij 13° C. Geur	Boter: Na 1 week bij 13° C. Smaak
1	13/1 '43	H	2½, 2½, 2	1,05	1,7	ar	ar-	G	½, 0, 0	1,0	0,3	n	n
2	14/1 '43	H	2½, 2½, 2	0,9	1,65	ar	ar	G	½, 0, 0	0,85	0,4	z. z. a	z. z. a
3	27/1 '43	H	2½, 2½, 2	0,85	1,6	ar	z. a	O	1, 0, 0	0,8	0,75	z. z. a	z. z. a
4	28/1 '43	H	2½, 2½, 2	0,9	1,7	ar	ar—	O	1, 0, 0	0,85	0,5	n	z. z. a
5	10/2 '43	H	2½, 2½, 2	0,65	0,95	ar	z. a	Z	½, 0, 0	0,5	0,25	n	n
6	11/2 '43	H	2½, 2½, 2	0,6	1,1	ar	ar	Z	½, 0, 0	0,45	0,25	n	n
7	24/2 '43	H	2½, 2½, 2	0,75	0,9	z. a	ar—	S	0, 0, 0	0,45	0,25	n	n
8	25/2 '43	H	2½, 2½, 2	0,7	1,15	ar	ar—	S	0, 0, 0	0,4	0,25	n	n
9	10/3 '43	W	2, 2½, 3	0,9	1,75	ar	z. a	Z	½, 0, 0	0,6	0,35	n	n
10	11/3 '43	W	2, 2½, 3	0,85	1,75	z. a	z. a	Z	½, 0, 0	0,55	0,35	n	n
11	24/3 '43	D	2, 3, 4	0,6	1,4	ar	ar	S	0, 0, 0	0,4	0,35	n	n
12	25/3 '43	D	2, 3, 4	0,6	1,2	ar	ar	S	0, 0, 0	0,6	0,25	n	n
13	7/4 '43	110A	3½, 3, 2½	0,85	1,4	ar	ar	Z	0, 2, 1	0,7	0,95	n	n
14	8/4 '43	110A	3½, 3, 2½	0,7	1,25	ar	ar	Z	0, 2, 1	0,55	0,80	z. a	z. a
15	12/5 '43	H 1	2, 2, 2	1,3	1,4	ar	ar	S	1, 0, 0	0,65	0,3	n	n
16	13/5 '43	H 1	2, 2, 2	1,25	1,5	ar	ar	S	1, 0, 0	0,7	0,35	n	n
Gemiddeld diac.-gehalte. . . . . *(Average diacetyl content)*				0,84	1,40					0,63	0,42		
Idem na aftrek proef 13 en 14 . . . . . *(Ditto after deduction of experiment 13 and 14)*				0,85	1,41					0,63	0,35		
Experiment N°.	*Date*	*Weakly reducing starter (aromatic)*	*Creatintest **	*Butter: Fresh Diac. mg/kg*	*Butter: After 1 week at 13° C. Diac. mg/kg*	*Butter: After 1 week at 13° C. Odour*	*Butter: After 1 week at 13° C. Taste*	*Strongly reducing starter*	*Creat.-test **	*Butter: Fresh Diac. mg/kg*	*Butter: After 1 week at 13° C. Diac. mg/kg*	*Butter: After 1 week at 13° C. Odour*	*Butter: After 1 week at 13° C. Taste*

TABLE 5. *Parallel experiments in the butter factory of the Dairy Experimental Farm.*

* De 3 cijfers der kreatineproef geven de geschatte sterkte der kreatinereactie op 3 achtereenvolgende dagen in hetzelfde monster aan.
The three figures give the estimated power of the creatinreaction on 3 consecutive days in the same sample.

hierbij echter abnormaal, doordat de citroenzuuromzetting langzaam verliep (zie kreatineproef). In zoo'n geval komen de reduceerende eigenschappen minder aan het licht. Ook bij proef N°. 13 was dit het geval, zonder dat dit bij de beoordeeling van geur en smaak tot uiting is gekomen.

Men doet er echter goed aan, aan deze geur- en smaakbeoordeeling geen absolute waarde toe te kennen. Duidelijk waarneembaar is het geur- en smaak*verschil* tusschen twee monsters en men is dan al gauw geneigd de boter met de boter met de minste geur en smaak maar als neutraal te beoordeelen.

Veel scherper en objectiever is de beoordeeling met behulp van het diacetyl getal. In alle boters bereid met zwak reduceerende zuursels vindt gedurende een week bewaren een stijging van het diacetylgehalte plaats, in alle bereid met sterk reduceerende zuursels een daling behalve weer bij proef N°. 13 en N°. 14.

Gemiddeld steeg in de aromatische boters het diacetylgetal bij de laboratoriumproeven van 0,86 tot 1,68 en bij de fabrieksproeven van 0,85 tot 1,41 mg per kg.

Bij de neutrale boters daalde het bij de laboratoriumproeven van 0,84 tot 0,50 en bij de fabrieksproeven van 0,63 tot 0,35 mg per kg.

Men kan de reduceerende werking der aromabacteriën in boter bereid met sterk reduceerend zuursel ook heel goed aantoonen met behulp van de kreatinereactie in het serum der boter. Zoo werd op 1-6 '44 boter bereid met het sterk reduceerende zuursel 110. Door uitsmelten van een portie boter werd op verschillende dagen de kreatinereactie uitgevoerd in 2½ cc van het boterserum. De resultaten waren als volgt:

Bepaling	Kreatinereactie
versch	1½
na 1 dag	½
na 2 dagen	¼
na 4 dagen	0

Binnen 4 dagen was dus het aanvankelijk aanwezige acetylmethylcarbinol geheel gereduceerd. Het is duidelijk, dat ook het eventueel aanwezig diacetyl zal zijn omgezet en dat er van aroma in een dergelijke boter geen sprake meer kan zijn.

Wat in de tabellen 4 en 5 ten slotte bijzonder duidelijk is, is de groote overeenstemming tusschen het diacetylgehalte en de aromatische geur en smaak waaruit de groote beteekenis van het diacetyl voor het boteraroma onweerlegbaar blijkt.

De hierboven gestelde vraag moet dus als volgt beantwoord worden: Inderdaad is de reductie-activiteit van het zuursel ook nog van invloed op het diacetyl in de reeds gevormde boter. *Het is dus uitgesloten, dat met sterk reduceerende zuursels aromatische boter kan worden bereid.* Voor de bereiding van aromatische boter dient gebruik gemaakt te worden van een aromatisch (zwak reduceerend) zuursel, d.w.z. een zuursel, dat, gekweekt bij ± 21° C, respectievelijk 24, 48 en 72 uur na de enting (0,5 %) een positieve kreatinereactie geeft.

Dit wil nu echter niet zeggen dat bij het gebruik van aromatisch zuursel aromatische boter ontstaat. De aromavorming is behalve van het zuursel ook nog van een aantal andere factoren afhankelijk, die wij in de volgende hoofdstukken zullen bespreken.

Daar het gewenscht was bovenstaande feiten in de practijk te bevestigen, werd gaarne ingegaan op een voorstel van de Commissie voor Kwaliteitsverbetering van den F.N.Z. om eenige practijkproeven te nemen.

Weliswaar werden deze proeven speciaal opgezet om de vraag uit te maken of aroma aan boter gewenscht is en ook om keurmeesters over het geheele land het verschil tusschen aromatische en neutrale boter goed te doen leeren kennen, maar tegelijkertijd gaven deze proeven ons de gelegenheid te demonstreeren op welke wijze men neutrale en aromatische boter kan maken.

De proeven, welke helaas door de moeilijke tijdsomstandigheden niet verder konden worden voortgezet, werden in 1944 genomen en betroffen een z.g. voorproef om het peroneel van de fabriek met de werkwijze vertrouwd te maken en de technische mogelijkheden te bezien en een hoofdproef. Zij werden genomen in de Coop. Zuivelfabriek „West-Friesland" te Lutjewinkel.

De belangrijkste resultaten waren de volgende:

Voorproef

4200 l gepasteuriseerde room werd na omroeren verdeeld over 2 zuringstanks. De eerste werd geënt met zuursel van de fabriek, dat zwak reduceerend was (LW), de tweede met door ons verstrekt sterk reduceerend zuursel (110). De behandeling geschiedde verder geheel gelijk. Na de bereiding (op 21 April 1944) werden de boters verzonden naar de N.C.Z. te Amsterdam en daar op 27 April door 3 keurmeesters te midden van ± 60 andere boters gekeurd. Wij zelf gaven ook onze waardeering van het aroma, waarna op 28 April de diacetylgehalten werden bepaald. Tabel 6 geeft een overzicht van het resultaat.

Tabel 6 Beoordeeling van boter bereid met zwak- en sterk reduceerend zuursel.

Zuursel	Beoordeeling				Diac. mg/kg
	N.C.Z.		R.L.P.S. Hoorn		
	Geur	Smaak	Geur	Smaak	
L.W. (zwak reduceerend) . . . *(weakly reducing)*	3	10	ar	ar	1,2
110 (sterk reduceerend) . . . *(strongly reducing)*	2	9	n	n	0,3
	Odour	*Taste*	*Odour*	*Taste*	
Starter	*N.C.Z.*		*Exp. Stat. Hoorn*		*Diac. mg/kg*
	Judgement				

Table 6 *Judgement of butter manufactured with a weakly- and strongly reducing starter.*

Het verschil in geur en smaak was uitermate duidelijk en de gevonden diacetylgetallen komen er geheel mee overeen. De keurmeesters der N.C.Z.

karakteriseerden boter 110 als „goed zonder meer" en boter L.W. als „aromatisch". Ook de botermaker van de fabriek vond het verschil zeer opvallend en prefereerde de aromatische boter.

HOOFDPROEF

Deze werd op dezelfde wijze als de voorproef uitgevoerd, met dien verstande, dat er thans 2 parallelproeven genomen werden. Op 3 Mei 1944 werden boters bereid met het aromatische zuursel van Hoorn (H) en het sterk reduceerende zuursel 110, terwijl op 4 Mei boter bereid met zuursel L.W. vergeleken werd met boter van het zuursel 110.

Er werden weer vaten ter keuring naar het keuringslokaal van de N.C.Z. gestuurd, waar zij gekeurd werden temidden van een aantal andere practijkboters. De verzending duurde door de omstandigheden zeer lang, terwijl een aantal vaten boter werden gestolen. De keuring, die op 11 Mei gehouden werd, bood daarom geen goede maatstaf, daar sommige boters, w.o. ook door ons bereide proefboters, pas de vorige dag gearriveerd waren en dus slechts één dag bij een temperatuur van 13° hadden gestaan. Het resultaat was dan ook teleurstellend. De verschillen waren over het algemeen zeer gering.

Op 17 Mei werden de boters opnieuw gekeurd. De keuring geschiedde door 15 keurmeesters, welke waren aangewezen door de Bonden, de Verkoopvereenigingen, het Z.K.B. en de F.N.Z. Behalve de normale keuringscijfers werden ook aparte cijfers voor het aroma gegeven volgens de volgende schaal:

Veel aroma 4
goed aroma 3
matig aroma 2
geen aroma 1.

Na afloop der geheele keuring werden de 4 proefmonsters nog eens 2 aan 2 door alle keurmeesters nagekeurd op aroma. Op 18 Mei werden de diacetylgehalten bepaald.

De resultaten zijn vereenigd in tabel 7.

TABEL 7 Keuring van twee weken oude boter bereid met zwak en sterk reduceerend zuursel door 15 keurmeesters.

Zuursel	Datum		Gemiddeld Aromacijfer		Diac. mg/kg
	Bereiding	Keuring	Keuring	Herkeuring	
H	3 Mei	17 Mei	2,4	2,8	1,50
110	3 „	17 „	2,1	1,6	0,65
L.W.	4 „	17 „	2,2	2,8	1,50
110	4 „	17 „	1,7	1,5	0,20
Starter	*Manufacture*	*Judging*	*Score*	*2d score*	*Diac. mg/kg*
	Date		*Average Aroma figure*		

TABLE 7 *Testing of two weeks old butter manufactured with weakly and strongly reducing starter by 15 judgers.*

Wederom zien we dus een belangrijk verschil in diacetylgehalte der boters bereid met de aromatische zuursels (H en L.W.) en de boters bereid met het sterk reduceerende zuursel (110). Reeds bij de eigenlijke keuring, maar nog veel sterker bij directe vergelijking, zooals dit bij de nakeuring geschiedde, kwam het verschil in aroma tot uiting in het gemiddeld oordeel van 15 uit alle deelen van het land bijeengekomen keurmeesters.

Het was dan ook geen wonder, dat in het door de F.N.Z. opgestelde rapport de volgende conclusie genomen werd:

„Nu er extra aandacht aan het aroma besteed werd, was men, blijkens de daarbij verkregen resultaten, het er over eens, dat de boter, bereid met een sterk reduceerend zuursel, geen aroma had, terwijl de beide andere monsters een goed aroma bezaten".

Tevens waren de keurmeesters het er over eens, dat meer aroma aan de Nederlandsche boter gewenscht is.

Door deze in de practijk genomen proeven werd op overtuigende wijze het belang van het gebruik van zwak reduceerende zuursels voor de bereiding van aromatische boter bewezen. *

* Voor de van alle zijden verleende medewerking bij deze practijkproef, betuigen wij gaarne onze hartelijke dank.

III. DE INVLOED VAN ZUURSTOF OP DE AROMAVORMING

Dat de aanwezigheid van zuurstof voor de vorming van het diacetyl een noodzakelijke voorwaarde is, bleek behalve uit onze eigen onderzoekingen (1) ook uit het werk van tal van andere schrijvers.

MICHAELIAN en HAMMER (11) constateerden een sterke verhooging der diacetylproductie, indien zuurstof geleid werd door aangezuurde cultures van aromabacteriën, terwijl doorleiding van stikstof, waterstof of kooldioxyde juist het tegenovergestelde effect had. Bij doorleiden van zuurstof gedurende de zuring werd bij zuursels eveneens een verhooging van het diacetylgehalte gevonden, hoewel in mindere mate dan bij reincultures van aromabacteriën. Toevoeging van een extra hoeveelheid citroenzuur deed bij deze proeven het diacetylgehalte nog sterker stijgen.

BREWER, WERKMAN, MICHAELIAN en HAMMER (12) leidden onder gelijktijdig roeren lucht onder hoogen druk door zuursels. Het diacetylgehalte steeg hierdoor soms wel tot het honderdvoudige. Boter, bereid met dergelijk onder hoogen druk geaëreerd zuursel had een sterker aroma.

Reeds bij schudden van zuursel met lucht treedt een sterke verhooging van het diacetylgehalte op, waarvan het effect nog lang nawerkt, constateerden PRILL en HAMMER (13).

Ook OVERBY (4) vond een sterke verhooging van diacetylgehalte door schudden met lucht.

VIRTANEN en TARNANEN (14) toonden aan, dat er slechts diacetyl ontstaat, als gedurende de zuring van het zuursel of de room zuurstof aanwezig is. Boter, verkregen uit zure room, waardoorheen lucht was geleid, was in verschen toestand veel aromatischer dan normaal bereide boter, doch bij bewaren der boters verdween het verschil.

Om na te gaan of er werkelijk verschil in aroma ontstaat indien het bereidingsproces van de boter bij aan- of afwezigheid van de luchtzuurstof wordt uitgevoerd, werden de volgende 3 parallelproeven genomen.

Bij elke parallelproef werd 3,4 liter in de boterfabriek gepasteuriseerde room (vetgehalte 20 %) verdeeld over 2 steriele glazen flesschen en geënt met aromatisch zuursel H.

Flesch I, afgesloten met wattenprop, werd aerob gekweekt. Bij de eerste twee proeven werd nog een extra contact met zuurstof van de lucht teweeggebracht door halverwege de zuring een uur lang steriele lucht door te leiden, respectievelijk 10 minuten lucht door te schudden. Aangezien bij de eerste proef het citroenzuur toen reeds geheel was omgezet, is het de vraag, of dit nog eenig succes heeft gehad. Bij de derde proef werd een extra contact met luchtzuurstof achterwege gelaten. In alle 3 gevallen werd de karnrijpe room in dezelfde flesch gekarnd en daarna op normale wijze afgewerkt tot boter. Bij proef 1 was het citroenzuur op het moment van karnen geheel omgezet, bij de beide andere proeven bijna.

Flesch II, gevuld met de geënte room, werd vóór de zuring luchtledig gepompt. De zuring verliep hier dus geheel anaerob. Doch ook gedurende het karnen werd geen lucht toegelaten.

Vervolgens werd de boter op normale wijze afgewerkt, waarbij dus niet te vermijden was, dat er gedurende het kneden nog wat lucht ingesloten werd.

Bij de eerste en derde proef was de citroenzuurreactie van de karnemelk negatief, bij de tweede proef nog juist positief.

Het resultaat der 3 proeven werd in tabel 8 vereenigd.

TABEL 8 Parallelproeven met boter, onder aerobe en anaerobe omstandigheden bereid.

Proef N°.	Aerob					Anaerob				
	Karnemelk	Boter				Karnemelk	Boter			
		Versch	Na 1 week bij 13° C.				Versch	Na 1 week bij 13° C.		
	Diac. mg/kg			Geur	Smaak	Diac. mg/kg			Geur	Smaak
1	3,1	1,1	1,95	ar	ar	0,75	0,25	0,6	n	n
2	?	1,2	2,1	ar	ar	1,3	0,5	0,6	n	n
3	3,4	0,9	1,8	ar	ar	1,0	0,3	0,9	n	n
	Diac. mg/kg			*Odour*	*Taste*	*Diac. mg/kg*			*Odour*	*Taste*
Experiment N°.	*Buttermilk*	*Fresh*	*After 1 week at 13° C*			*Buttermilk*	*Fresh*	*After 1 week at 13° C*		
		Butter					*Butter*			
	Aerob					*Anaerob*				

TABLE 8 *Parallel experiments with butter, manufactured under aerobic and anaerobic conditions.*

In overeenstemming met onze vroegere proeven (1), waaruit bleek, dat voor aromavorming een aerobe omzetting van het citroenzuur noodzakelijk is, blijkt ook hier zeer duidelijk, dat voor een goede ontwikkeling van het aroma in de boter een aerobe zuring een absolute voorwaarde is. Dit blijkt zoowel uit de geur- en smaakwaarnemingen als uit het diacetylgehalte. Ook het verschil in diacetylgehalte der monsters karnemelk was zeer groot, hetgeen ook sterk in de smaak en geur hiervan tot uitdrukking kwam. Nu blijkt ook hier weer evenals bij de proeven der tabellen 4 en 5, dat het diacetylgehalte der boter bij bewaren aanmerkelijk stijgt. We kunnen dus onderscheiden een vorming van diacetyl gedurende de zuring en het karnen en de vorming gedurende het bewaren van de boter. Of dit onderscheid tusschen de directe vorming en de nawerking in boter essentieel is, is daarmee nog niet gezegd.

Het kwam ons gewenscht voor om de directe vorming van diacetyl gedurende het zuringsproces e.v. het karnen nader te bestudeeren.

A. DE AFHANKELIJKHEID VAN HET DIACETYLGEHALTE VAN DE HOEVEELHEID AANWEZIGE ZUURSTOF TIJDENS HET ZUREN EN HET KARNEN.

In een groot aantal proeven is deze afhankelijkheid vastgesteld. Zij werden, tenzij anders is vermeld, genomen in centrifugemelk bij een temperatuur van 21° C. De diacetylgetallen werden bepaald met behulp van de methode

van PRILL en HAMMER. Hieronder worden de belangrijkste conclusies, waartoe het onderzoek leidde, opgesomd en aan de hand van voorbeelden toegelicht.

a. Bij aerobe zuring stijgt het diacetylgetal tot een zekere waarde en blijft daarna bij zwak reduceerende zuursels vrijwel constant, bij anaerobe zuring treedt na een aanvankelijke stijging een sterke daling van het diacetylgetal op.

Als voorbeeld geven wij 2 proeven, genomen met het zuursel H. Bij de eerste proef (tafel 9, fig. 2A) bedroeg de enting 0,01 %, bij de tweede (tabel 10, fig. 2B) 0,05 %. De anaerobe kweeking geschiedde in leeggepompte en dichtgesmolten kolven. In beide gevallen verliep de zuring bij aenaerobe kweeking iets sneller.

TABEL 9

Aantal uren na de enting *Number of hours after inoculation*	Aerob			Anaerob		
	Titer °D	pH	Diac. mg/kg	Titer °D	pH	Diac. mg/kg
17	23,8	6,11	0,15	33,5	5,64	0,2
23	45,4	5,22	0,4	78,5	4,48	0,5
41	91,5	4,31	1,55	96,5	4,28	1,3
65	99,4	4,26	1,7	103,7	4,26	0,7

TABEL 10

Aantal uren na de enting *Number of hours after inoculation*	Aerob			Anaerob		
	Titer °D	pH	Diac. mg/kg	Titer °D	pH	Diac. mg/kg
23	60,9	4,72	0,95	77,8	4,44	1,5
43	92,5	4,32	2,25	97,2	4,27	0,75
67	92,9	4,34	1,85	98,3	4,30	0,35
91	96,5	4,18	1,7	98,3	4,18	0,15
143	96,1	4,19	1,7	101,5	4,20	0,15

Met opzet spraken we in onze conclusie van diacetyl*getal* en niet van diacetyl*gehalte*. Immers, het is nog zeer de vraag of het onder anaerobe omstandigheden bepaalde diacetyl wel werkelijk diacetyl is. Men krijgt de indruk, dat er gedurende de zuring aanvankelijk een stof wordt geproduceerd die in de diacetylbepaling mee reageert, doch spoedig verdwijnt. We komen hier nader op terug, doch willen nog wel vermelden, dat aan de anaerobe cultures noch bij een diacetylgetal van 1,3 (tabel 9), noch van 1,5 (tabel 10) eenig aroma kon worden geconstateerd.

Fig. 2. Verloop van het diacetylgehalte in zwak reduceerende zuursels bij aerobe (I) en anaerobe (II) kweeking. A = geënt met 0,01 % zuursel H; B = geënt met 0,05 % zuursel H.

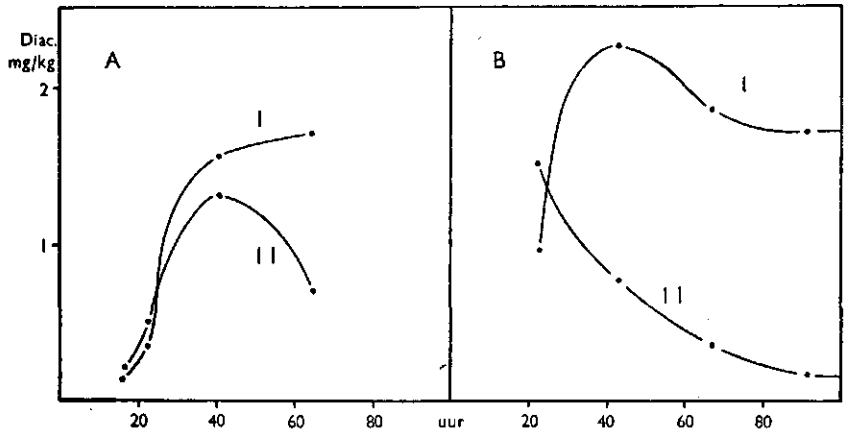


Fig. 2. Progress of the diacetylcontent in weakly reducing starters at aerobic (I) and anaerobic (II) cultivation. A = inoculated with 0,01 % starter H; B = inoculated with 0,05 % starter H.

b. Het diacetyl vormt zich hoofdzakelijk in de oppervlaktelaag van de zurende cultuur.

Dit werd op 2 wijzen bewezen. In de eerste plaats werd zuursel gekweekt in een hoog vat van 5 l, voorzien van 3 aftapinrichtingen op verschillende hoogten (zie fig. 3). De diacetylbepalingen geschiedden van monsters van de

Fig. 3. Model van vat, voorzien van 3 aftapinrichtingen op verschillende hoogten

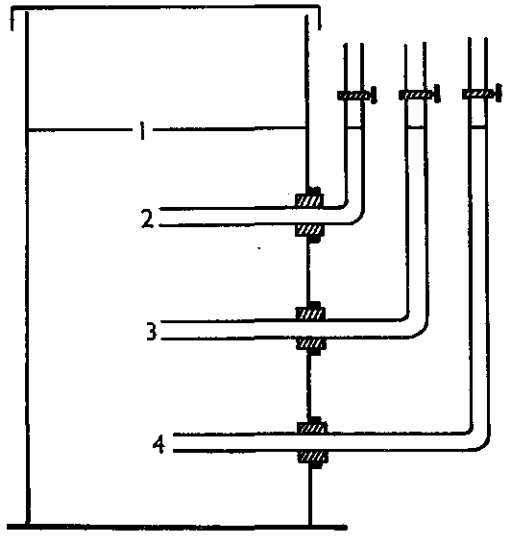


Fig. 3. Container, provided with 3 drain installations on different heigths.

plaatsen 1 (oppervlakte laag), 2, 3 en 4. Wij vermelden hier een proef met zuursel H (enting 0,5 %), ingezet op 8-4 '42 te 17 uur en bepaald op 10-4 '42. Met opzet werd wat lang gewacht om geen last te ondervinden van de onder *a* genoemde tusschenstof.

TABLE 11 Diacetylgehalte in verschillende lagen in zuursel H, gekweekt in een hoog vat.

Laag	Diac. m/kg
1	2,95
2	0,3
3	0,25
4	0,25
Layer	*Diac. mg/kg*

TABLE 11 *Diacetyl content in different layers in starter H cultivated in a high container.*

Bij de tweede methode werd 60 cm³ met 0,5 % zuursel geënte centrifugemelk gekweekt eenerzijds in een hooge cylinder met een middellijn van 3 cm en anderzijds in een groote cultuurschaal met een middellijn van 18 cm, zoodat de oppervlakken, die aan de lucht waren blootgesteld, zich verhielden als 7 : 254. Op 17-3 '42 te 17 uur geënt, werd, na goed mengen van het monster, op 19-3 '42 het diacetylgehalte bepaald in 50 gr, dus in bijna de geheele hoeveelheid.

Tabel 12 vermeldt het resultaat bij 2 verschillende zuursels.

TABEL 12 Vergelijking der diacetylvorming in hooge cylinders en platte schalen, na 40 uren bij een enting met 0,5 %. (Bij kweeken in dunne lagen, treedt vrijwel altijd een sterke vanillegeur op.)

Zuursel	Kweekwijze	Geur	Smaak	Diac. mg/kg
110A	platte schaal *flat dish*	aroma, vanille *aroma, vanilla*	sterk aromatisch *strongly aromatic*	6,05
	hooge cylinder *high cylinder*	geen aroma *no aroma*	zuur *sour*	0,8
H	platte schaal *flat dish*	aroma, vanille *aroma, vanilla*	sterk aromatisch *strongly aromatic*	6,85
	hooge cylinder *high cylinder*	geen aroma *no aroma*	zuur *sour*	0,7
Starter	*Way of cultivating*	*Odour*	*Taste*	*Diac. mg/kg*

TABLE 12 *Comparison of the formation of diacetyl in high cylinders and flat dishes after 40 hours, inoculated with 0,5 %. (When the cultivation takes place in thin layers, a strong vanilla-odour occurs nearly always.)*

Op beide wijzen werd dus zeer duidelijk aangetoond, dat het diacetyl zich hoofdzakelijk in de oppervlaktelaag vormt.

c. Intensief in aanraking brengen met luchtzuurstof door schudden met lucht of doorleiden van lucht gedurende de zuring, verhoogt de hoeveelheid diacetyl.

Door één van 2 kolven melk, beide geënt met 0,5 % zuursel H, werd gedurende de proef steriele lucht gezogen. In de geaereerde kolf ontstond een aanmerkelijk hooger diacetylgehalte dan in de niet geaereerde contrôlekolf, zooals de volgende cijfers laten zien (tabel 13).

TABEL 13 Het effect van lucht doorleiden op het diacetylgehalte van zuursel.

Aantal uren na enting	Diac. mg/kg	
	Contrôle	Bij luchtdoorleiding
16	1,0	1,7
24	2,2	5,4
42	1,5	3,8
Number of hours after inoculation	*Control*	*Aerated*
	Diac. mg/kg	

TABLE 13 *The effect of air on the diacetyl content of the starter.*

In een andere proef werd de proefkolf elk kwartier krachtig omgeschud. Zij bevatte uiteindelijk 4,15 mg diac. per kg, terwijl de niet geschudde kolf op hetzelfde tijdstip 2,8 mg bevatte. De proef was wederom uitgevoerd met het practijkzuursel H.

Wordt vóór den aanvang van de zuring, dus vóór de enting lucht doorgeleid, dan heeft dit geen enkel effect. Bij een proef met het zuursel H, waarbij ruim 1 uur lucht was doorgeleid vóór de enting, bedroeg het diacetylgehalte in het rijpe zuursel 0,95 mg, terwijl dit bij de niet geaereerde contrôlekolf 0,8 mg per kg bedroeg; bij een andere proef, waarbij van te voren 5 uur lang lucht doorgeleid was, waren deze cijfers respectievelijk 1,15 en 1,15 mg.

Het is voor een optimale diacetylvorming dus beslist noodzakelijk, dat de cultuur *gedurende de zuring* in aanraking met de lucht is. De van te voren in de melk opgeloste hoeveelheid lucht is voor de aromavorming van geen belang. Het is aannemelijk, dat deze zuurstof door de melkzuurbacteriën van het zuursel wordt weggenomen (gereduceerd).

d. Het effect van het doorleiden van lucht op de vorming van diacetyl is groot, zoolang het citroenzuur in de melk nog niet geheel is omgezet; daarna is het soms ook nog wel merkbaar.

De vraag, of aanwezigheid van citroenzuur van invloed is op het effect der luchtdoorleiding was van belang, omdat hieruit misschien geconcludeerd zou kunnen worden of het voor goede aromavorming gewenscht zou zijn de room te verkarnen op een tijdstip dat al het citroenzuur nog niet is omgezet.

Een scherpe scheidslijn kon echter niet getrokken worden, zooals de volgende tabel laat zien.

TABEL 14 Invloed van aan- of afwezigheid van citroenzuur op het diacetylgehalte bij het extra toevoeren van luchtzuurstof.

Datum 1942	Zuursel N°.	Enting in %	Lucht doorgeleid (l), geschud (s), of gekarnd (k) in uren na enting	Bepaling in uren na enting	Citr. zuur	Diac. mg/kg Proef	Contrôle	Verschil
10/2	H	0,5	van 16½—18½ u. (l)	20½	+	3,35	1,15	2,2
23/2	H	0,5	voortdurend (l)	16	+	1,7	1,0	0,7
23/3	H	0,5	van 17½—18½ u. (l)	18½	+	4,0	1,85	2,15
30/3	H	0,5	van 16¾—17½ u. (k)	17½	+	4,25	2,2	2,05
1/7	H	2	van 27 —28 u. (k)	28	—	2,25	1,55	0,7
14/9	H	0,5	van 48 —48½ u. (s)	48½	—	0,9	0,9	0
14/9	M I	0,5	van 48 —48½ u. (s)	48½	—	2,35	1,35	1,0
21/9	H	0,5	van 48 —48½ u. (s)	48½	—	0,85	0,65	0,2
28/9	D 1	0,5	van 48 —48½ u. (s)	48½	—	2,20	1,15	1,05
28/9	110A	0,5	van 48 —48½ u. (s)	48½	—	0,85	0,95	-0,1
22/10	D 1	0,5	van 120—120½ u. (s)	120½	—	2,40	2,65	-0,25
Date 1942	*Sturter N°.*	*Inoculation in %*	*Aerated* (l), *shaked* (s), *churned* (k) *in hours after inoculation*	*Determination in hours after inoculation*	*Citric acid*	*Experiment*	*Control*	*Difference*
						Diac. mg/kg		

TABLE 14 *Influence of presence or absence of citric acid on diacetyl content, when extra oxygen from the air is being supplied.*

Bij deze proeven werden de zuursels dus aerob gekweekt en werd door schudden, karnen of lucht doorleiden slechts een extra hoeveelheid zuurstof toegevoerd.

e. Het effect van zuurstof doorleiden is zeer snel merkbaar en berust blijkbaar op een chemische oxydatie.

Bij de in tabel 14 vermelde proeven is de bepaling meestal direct na de behandeling met lucht geschied.

Bij een deel dezer bepalingen is de contrôle waarde, de vóór het schudden, karnen of lucht doorleiden gevonden waarde. Dit was mogelijk, omdat de invloed van luchtzuurstof op het diacetylgehalte zeer snel plaats vindt, zooals de volgende proeven dit ook nog eens duidelijk demonstreeren.

I. Centrifugemelk, geënt met 0,1 % zuursel, werd kort na de stremming, op een moment dat de citroenzuurreactie nog sterk positief was, gedurende 30 minuten krachtig op mechanische wijze geschud.

Zuursel No.	Diac. in mg/kg Vóór het schudden	Na 30 min. schudden
H	1,60	4,20
110A	2,25	4,00

II. 1 l volle melk, geënt met 0,5 % zuursel H, werd verdeeld over 2 flesschen. Terwijl de eerste flesch rustig bleef staan, werd de tweede enkele keeren gekarnd, zonder dat echter zichtbare botervorming optrad. Tabel 15 geeft van deze proef nadere bijzonderheden.

TABEL 15 De invloed van het karnen op de vorming van diacetyl op verschillende tijdstippen. (Enting 8-4 '42 te 17 uur).

Uren na enting	Niet gekarnd	Gekarnd	
	Diac. mg/kg	Uren na enting	Diac. mg/kg
16	2,0		1,55
		16.45—16.55	
16.55	—		3,95
		17.00—17.35	
17.35	2,5		5,1
22.30	2,6		6,75
Hours after inoculation	*Diac. mg/kg*	*Hours after inoculation*	*Diac. mg/kg*
	Not churned	*Churned*	

TABLE 15 *Effect of churning on the formation of diacetyl on different points of time. (Inoculation 8-4 '42 at 5 a.m.)*

Het effect der karnbeweging is duidelijk. Ook schijnt er nog een zekere nawerking plaats te vinden.

Fig. 4. Effect van een half uur schudden met lucht op het diacetylgetal van zwak reduceerend zuursel H, na anaerobe kweeking gedurende verschillende tijden.
A = niet geschud.
B = een half uur geschud met lucht.
C = hoeveelheid nog aanwezig citroenzuur.

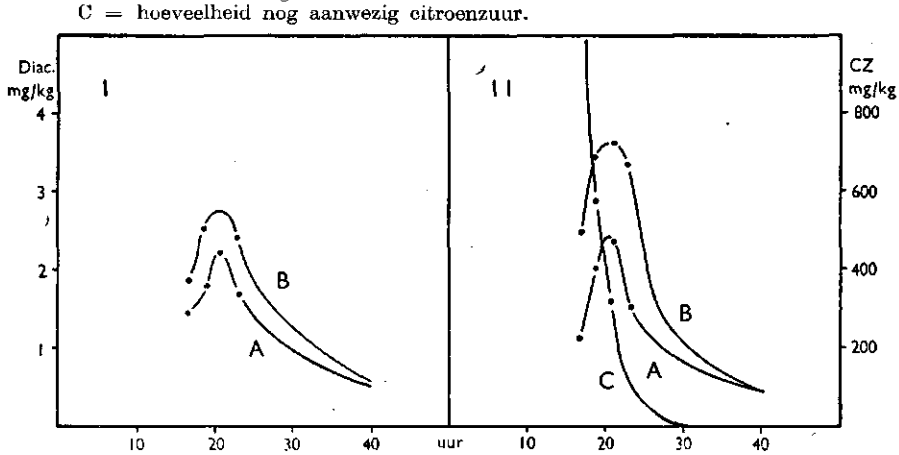


Fig. 4. The effect of half an hour's shaking with air on the diacetyl figure of weakly reducing starter H, which have been cultivated during different periods of time, anaerobically.
A = not shaked.
B = half an hour's shaking with air.
C = still existent quantity of citric-acid.

III. 1½ l gepasteuriseerde centrifugemelk werd geënt met 0,3 % zuursel H en daarna hiermede 10 stopfleschjes geheel gevuld en bij 21° C geplaatst. Na verschillende tijden werd het diacetylgehalte in een deel der inhoud van een fleschje bepaald, waarna de rest een half uur krachtig mechanisch geschud werd en opnieuw bepaald. Tabel 16 geeft een overzicht van 2 proeven.

TABEL 16 Effect van een half uur schudden met lucht op het diacetylgetal van zuursels, gedurende verschillende tijden anaerob gekweekt.

Proef I				Proef II			
Uren na enting	pH	Diacetyl mg/kg		pH	Citroenzuur 1 aq in mg/kg	Diacetyl mg/kg	
		Direct	Na schudden			Direct	Na schudden
17	5,08	1,45	1,90	4,75	1015	1,15	2,50
19	4,63	1,80	2,55	4,53	567	2,05	3,50
21	4,62	2,25	8,00 ?	4,46	331	2,40	3,65
23	4,42	1,70	2,40	4,45	spoor	1,55	3,40
41	4,32	0,50	0,55	4,22	0	0,45	0,45
Hours after inoculation	*pH*	*Directly*	*After shaking*	*pH*	*Citric acid mg/kg*	*Directly*	*After shaking*
		Diacetyl mg/kg				*Diacetyl mg/kg*	
Experiment number I				*Experiment number II*			

TABLE 16 *The effect of half an hour's shaking with air on the diacetyl figure of starters, which have been cultivated during different periods of time anaerobically.*

De resultaten zijn tevens weergegeven in de figuur 4. Behalve het zeer duidelijke directe effect van schudden op het diacetylgetal, zien we hier weer bij de anaerobe kweeking een stof ontstaan, die als diacetyl reageert, doch naderhand, als het citroenzuur omgezet is, verdwijnt. Dan heeft het schudden ook geen effect meer. Men krijgt den indruk, dat deze stof een belangrijke rol bij de uiteindelijke vorming van het diacetyl speelt.

IV. Bij het karnen der room in de boterfabriek der Proefzuivelboerderij werden op verschillende tijdstippen monsters genomen en het diacetylgehalte bepaald. In de boterfabriek was eveneens het zuursel H in gebruik. De proef werd genomen op 28-4 '42.

Tijd	Monster	Diac. in mg/kg
6.35	Vóór het karnen	2,45
6.37	Karn aangezet	
6.42	Na 5 min. karnen	2,9
6.45	Karn weer aangezet	
7.06	Na 26 min. karnen	3,05
7.31	Karn af	

Hoewel minder uitgesproken, treedt ook hier een duidelijke verhooging van het diacetylgehalte op, die reeds na 5 minuten karnen merkbaar is.

f. Door schudden met lucht ontstaat inderdaad diacetyl.

Dit werd op de volgende wijze aangetoond.

Een stopflesch van 2 l werd geheel gevuld met gepasteuriseerde centrifugemelk, welke geënt was met ½ % zuursel H. Na plaatsing bij 21° C werd gewacht totdat stremming was opgetreden, doch de citroenzuurreactie nog behoorlijk sterk was. Hierna werd verdeeld in 2 porties van 1 l (A en B). In 50 gr. van A werd diacetyl bepaald volgens PRILL en HAMMER. Gevonden werd 0,8 mg diacetyl per kg. De rest werd in een kolf, voorzien van lange rectificeerkolom en koeler gebracht, en na doorleiden van stikstof gedestilleerd. Het distillaat bevatte een weinig van een met waterdamp zeer vluchtige stof, welke met 2—4 dinitrophenylhydrazine een neerslag gaf. De opbrengst was echter te klein om het gevormde hydrazon nauwkeuriger te kunnen identificeeren.

De portie B werd een half uur in een karnflesch gedraaid en daarna op dezelfde wijze behandeld. Het diacetylgetal bedroeg 2,8 mg per kg. Bij destilleeren ontstond een zeer veel grooter neerslag met 2—4 dinitrophenylhydrazine, dat omgekristalliseerd uit nitrobenzol en uitgewasschen met aether bij ± 345° — 350° C smolt onder ontleding. Ook het 2—4 dinitrophenylhydrazon van zuiver diacetyl smolt bij deze temperatuur, terwijl het mengsmeltpunt geen verlaging vertoonde. Bij gebruik van te weinig 2—4 dinitrophenylhydrazine ontstaat de monoverbinding met een smeltpunt van 176° C.

Uit deze proefnemingen is het dus wel duidelijk, dat bij intensieve aanraking van zuursel met luchtzuurstof, indien al het citroenzuur nog niet is omgezet, diacetyl ontstaat.

g. De stof, waaruit het diacetyl door oxydatie gevormd wordt, kon niet worden gevonden.

Nog steeds is in de literatuur de meening verbreid, dat het diacetyl gevormd wordt door oxydatie van het acetylmethylcarbinol. Reeds in een vorige publicatie (1) hebben we er op gewezen, dat dit niet juist is. Na anaerobe omzetting van het citroenzuur kan, hoewel veel carbinol aanwezig is, door aanraking met zuurstof van de lucht, geen aroma meer ontstaan. Ook MICHAELIAN en HAMMER (11) bewezen op overtuigende wijze, dat het acetylmethylcarbinol in een concentratie, gelijk aan die in zuursel en onder dezelfde omstandigheden niet door lucht tot diacetyl wordt geoxydeerd. Zij trokken daaruit de conclusie, dat het acetylmethylcarbinol in een zuursel niet op chemische, doch op biologische wijze wordt geoxydeerd. Aangezien echter uit onze proeven (zie dit hoofdstuk onder e) gebleken is, dat de oxydatie wel degelijk een chemische is, leveren hun proeven naar onze meening slechts het bewijs, dat het *niet* het acetylmethylcarbinol is, waaruit het diacetyl door oxydatie ontstaat.

In ons schema van de omzetting van citroenzuur door de aromabacteriën (1) hebben wij met dit feit rekening gehouden en eenvoudigheidshalve de veronderstelling geopperd, dat het diacetyl uit het acetaldehyde zou ontstaan.

Dit werd echter niet bewezen en het is duidelijk, dat ook gedacht kan worden aan andere tusschenproducten der citroenzuurontleding.

Daar deze tusschenstof blijkbaar reeds door schudden met luchtzuurstof overgaat in diacetyl, hebben wij bij een aantal daarvoor in aanmerking komende stoffen nagegaan, of schudden met lucht tot de vorming van diacetyl leidde.

1. Aceetaldehyde

Aan 50 gr zuursel H, waarin het citroenzuur geheel was omgezet, werd ± 50 mg aceetaldehyde toegevoegd. Na 10 minuten schudden werd 1,1 mg diacetyl per kg gevonden tegen 1,25 mg in het onbehandelde zuursel. Dezelfde proef met ± 5 mg aceetaldehyde gaf respectievelijk 1,1 en 1,15 mg/kg. Van eenige verhooging was dus geen sprake.

2. Acetylmethylcarbinol

Uit tabel 14 blijkt, dat zich bij schudden met lucht ook nog diacetyl kan vormen, als het citroenzuur reeds geheel, zij het onder aerobe omstandigheden is omgezet.

Dit zou er misschien op wijzen, dat acetylmethylcarbinol geoxydeerd wordt tot diacetyl en in tegenspraak zijn met onze vroegere proeven.

In tal van proeven werd daarom nog eens geprobeerd acetylmethylcarbinol te oxydeeren tot diacetyl door schudden met lucht. Daartoe werd 300 mg carbinol opgelost in 1 l water of melk, al of niet aangezuurd tot een in zuursel voorkomende zuurgraad en vervolgens een half uur met lucht geschud of eenigen tijd in een dunne laag aan de lucht blootgesteld. Zoowel voor als na de behandeling werd het diacetylgetal bepaald, doch nimmer werd eenig verschil gevonden, hetgeen dus volkomen in overeenstemming is met de resultaten van MICHAELIAN en HAMMER (11).

Voor deze proeven werd gebruik gemaakt van het in den handel verkrijgbare dimere acetylmethylcarbinol, dat door omkristalliseeren uit aceton zuiver verkregen was (smeltpunt 85,5 ° C). Daar het mogelijk zou zijn, dat het monomere carbinol reactiever zou zijn, werd dit bereid volgens een methode, beschreven door SCHMALFUSZ en WERNER (15), door carbinol in een luchtledig gepompte buis 2 uur lang met glycerine op 120° C te verhitten. Met het aldus bereide monomere acetylmethylcarbinol (smeltpunt 15° C) kon door een half uur krachtig lucht doorleiden ook geen verhooging van het diacetylgetal worden bewerkstelligd. De concentratie van de carbinoloplossing, bepaald volgens PRILL en HAMMER bedroeg 240 mg per kg.

3. Pyrodruivenzuur

Het handelspyrodruivenzuur is over het algemeen zeer onzuiver, daar pyrodruivenzuur snel ontleedt. Het werd door 3 × in vacuo te destilleeren, gezuiverd. Bepaald volgens de analysemethode van SIMON en NEUBERG (16), bedroeg de zuiverheid toen 97 %. Het werd in de koude met Ca CO_3 behandeld, waardoor een oplossing van Ca-pyruvaat ontstond, die boven H_2SO_4 in vacuo gedroogd werd. Er ontstonden geen kristallen, doch een amorphe glasachtige massa, die na fijn poederen voor de proeven gebruikt werd. Ook werd een op-

lossing van het pyrodruivenzuur zelf gebruikt. Noch door schudden met lucht, noch door toevoeging aan uitgewerkt zuursel en aan de lucht laten staan kon eenige verhooging van het diacetylgetal worden bereikt.

4. Mengsels van stoffen

Er werden mengsels bereid van acetylmethylcarbinol + pyrodruivenzuur en acetylmethylcarbinol + citroenzuur. Een half uur schudden met lucht had hierop geen enkel effect.

5. Methylglyoxaal

Methylglyoxaal werd bereid volgens de methode van NEUBERG en HOFMANN (17). Bij schudden met lucht ontstond geen verhooging van het diacetylgetal. Wel bleek het methylglyoxaal in de bepaling mee te reageeren, aangezien het volgens de werkwijze van PRILL en HAMMER eveneens een roodgekleurde ijzer-ammoniumverbinding geeft. De vluchtigheid met waterdamp is echter gering. Volgens eenige oriënteerende bepalingen wordt bij de uitvoering der diacetylbepaling volgens PRILL en HAMMER nog geen 2 % methylglyoxaal overgedestilleerd. Het zou dus al in groote hoeveelheden aanwezig moeten zijn om storend bij de diacetylbepalingen te werken.

We mogen uit de hier vermelde proef wel concludeeren, dat ook methylglyoxaal het gezochte tusschenproduct niet is.

Vatten we de resultaten der genomen proeven over den invloed van luchtzuurstof gedurende het zurings- en het karnproces samen, dan kunnen we de volgende conclusie trekken:

Toetreding van zuurstof der lucht (aerobie) gedurende het zuren is noodzakelijk voor de vorming van diacetyl. De werking der zuurstof berust op een chemische oxydatie van een onbekend tusschenproduct der zich afspelende ontledingsprocessen, vermoedelijk van de citroenzuurontleding, daar na afloop van dit proces de invloed van zuurstof meestal spoedig ophoudt en na anaerobe omzetting van citroenzuur vorming van aroma of diacetyl vrijwel uitgesloten is. Hoe intensiever de aanraking met zuurstof der lucht is, des te hooger wordt het diacetylgehalte.

B. DE VORMING VAN DIACETYL GEDURENDE DE BEWARING VAN BOTER

Het is de vraag, of het gedurende de zuring en het karnen gevormde diacetyl nu wel van zoo groot belang is voor het aroma. Versche boter toch bezit vrijwel geen aroma. Dit treedt pas na eenigen tijd duidelijk op. Als voorbeeld geven we hier het resultaat van een keuringsproef met boter van de boterfabriek der Proefzuivelboerderij. De boter was bij 15° C bewaard.

Gekeurd na uren	Geur	Smaak	Gekeurd na uren	Geur	Smaak
Versch . . .	n	n	52 uren . .	ar	ar
3 uren . .	n	n	100 „ . .	ar	ar
8 „ . .	z. z. a	z. z. a	196 „ . .	ar	ar
27 „ . .	z. a	z. a			

Het aroma kwam hierbij tusschen den eersten en tweeden dag goed tot ontwikkeling, doch onze ervaring is, dat het nog wel langer duren kan, voordat het aroma komt.

Ook het diacetylgehalte stijgt parallel met de geur- en smaakontwikkeling, b.v.:

Boter bereid op 2/6 '42	Geur en smaak	Diac. in mg/kg
Versch . . .	neutraal	1,1
3/6	z. z. a	1,35
6/6	z. a	1,7
9/6	ar	1.9

De direct aanwezige hoeveelheid diacetyl schijnt dan ook niet van zoo groot belang te zijn. Wel kan men de versche boter reeds aromatisch maken door het zuursel of de room intensief met zuurstof te behandelen (HAMMER e.a. (12), VIRTANEN (14)), maar dit is een abnormale werkwijze, die wegens de mogelijkheid, dat het botervet geoxydeerd wordt en er dus een slechte smaak ontstaat, niet aan te bevelen is.

Nog sterker spreekt de betrekkelijke belangrijkheid van het diacetylgehalte der versche boter, indien men in de tabellen 4 en 5 ziet, dat bij sterk reduceerende zuursels het diacetylgehalte der versche boter vrijwel steeds even hoog ligt als bij gebruik van aromatische zuursels, terwijl er toch nimmer aromatische boter ontstaat. Het is duidelijk, dat er in het algemeen slechts aromatische boter ontstaat, als het diacetylgehalte bij bewaren stijgt. Staat deze stijging nu ook op een of andere wijze met de luchtzuurstof in verband? Kan het diacetylgehalte in de boter niet stijgen als de room anaerob gezuurd en gekarnd is? Uit de proeven van tabel 8 is reeds gebleken dat dit niet kan en het blijkt zelfs, dat aerob karnen al niet meer helpt als de room anaerob gezuurd wordt, tot dat al het citroenzuur is omgezet.

Zoo werd op 21/3 '44 room geënt met zuursel H en in 3 porties verdeeld. 1/3 deel werd aerob gezuurd en gekarnd, 1/3 deel anaerob gezuurd en gekarnd en 1/3 deel anaerob gezuurd maar aerob gekarnd.

Het resultaat was het volgende

Zuren	Karnen	Versche boter	Boter 8 dagen bij 13° C		
		Diac. mg/kg	Diac. mg/kg	Geur	Smaak
aerob	aerob	1,,0	2,0	ar—	ar
anaerob	anaerob	0,65	0,4	z. z. a	n
anaerob	aerob	0,65	0,35	n	n

Het is voor een goed verloop der aromavorming in boter dus eveneens noodzakelijk, dat de room aerob gezuurd en gekarnd wordt of m.a.w. het is

voor een goede aroma (diacetyl) vorming, dat het citroenzuur der room of althans een belangrijk deel ervan, bij aanwezigheid van luchtzuurstof wordt omgezet.

Wanneer dit geschied is, dan is het moment van karnen zelfs niet zoo van belang meer. Ook al is het citroenzuur reeds eenigen tijd geleden geheel omgezet op het moment van karnen, dan nog zal het aroma in voldoende mate ontstaan. Tabel 17 laat dit aan de hand van eenige proeven duidelijk zien.

Uit een oogpunt van overzuring en het ontstaan van metaalsmaak is het echter niet aanbevelenswaardig om langer te wachten dan strikt noodzakelijk is met het karnen. *De room is karnrijp, als een goede zuurgraad is bereikt en het citroenzuur bijna geheel is omgezet.*

Hoewel het tijdstip van karnen, dat gunstig is voor de vorming van het aroma in boter, binnen wijde grenzen kan varieeren, zien we toch wel dat het ook voor het aroma wenschelijk is niet te lang te wachten na de citroenzuuromzetting.

TABEL 17 Boterbereiding uit room met verschillend citroenzuurgehalte. Aerobe zuring met zuursel H.

Proef N°.	Zuursel %	Zurings-tijd	Zurings-temp.	Room			Boter			
				Titer	Kreat.-reactie	Citroen-zuur	Versch Diac. mg/kg	Na 1 week bij 13° C		
								Diac. mg/kg	Geur	Smaak
1	3 %	23 uren	14°	54° D	+	+	0,75	1,15	z. a	z. a
		25 „	14°	59° D	++	(+)	0,65	1,35	ar—	ar—
		29 „	14°	64° D	+++	(—)	0,75	1,35	ar	ar
2	8 %	23 uren	15°	56° D	++	(+)	1,0	2,0	ar—	ar
		25 „	15°	60° D	+++	(—)	1,0	1,95	ar	ar—
		29 „	15°	61° D	++++	—	0,65	1,4	ar—	z. a
3	8 %	23 uren	15°	60° D	+++	(+)	0,95	2,2	z. a	ar—
		28 „	15°	64° D	++++	—	0,65	2,05	z. a	ar—
		47 „	15°	67° D	++++	—	0,5	1,65	z.z.a	metaal
Experiment N°.	*Starter*	*Sourings-process time*	*Sourings-temp.*	*Titer*	*Creat.-reaction*	*Citric-acid*	*Diac. mg/kg Fresh*	*Diac. mg/kg*	*Odour*	*Taste*
								After 1 week at 13° C		
				Cream			*Butter*			

TABLE 17 *Manufacture of butter from creams with different citric acid-content. Aerobic souring with starter H.*

Het is beslist niet zoo, dat op het moment van karnen nog citroenzuur in de room aanwezig moet zijn, al zal dit bij de gebruikelijke wijze van werken meestal wel het geval zijn.

Het eventueel resteerende citroenzuur wordt in de boter ook niet veel verder meer omgezet. Slechts eenige uren na de bereiding vindt er nog omzetting plaats, doch dan houdt dit op, zooals eenige proeven in tabel 18 laten zien.

TABEL 18 Ontleding van citroenzuur in boter op verschillende tijdstippen.

Proef I	mg citroenzuur in 50 g botervocht	Proef II	mg citroenzuur in 50 g botervocht
Versch *(Fresh)* . .	31,8	Versch *(Fresh)* . .	22,0
Na 2½ uur *(hours)*	29,0	Na 7½ uur *(hours)*	13,8
„ 4 uren *(hours)*	22,8	„ 24 uren *(hours)* bij 18° C	14,7
„ 15 „ („)	23,9	„ 144 uren *(hours)* bij 18° C	17,3
Experiment I	*mg citric acid in 50 grammes butter serum*	*Experiment II*	*mg citric acid in 50 grammes butter serum*

Proef III	mg citroenzuur in 50 g botervocht
8 dagen *(days)* bij 5° C . . .	12,9
16 „ „ „ 5° C . . .	12,9
8 „ „ „ 18° C . . .	13,7
16 „ „ „ 18° C . . .	13,0
Experiment III	*mg citric acid in 50 grammes butter serum*

TABLE 18. *Decomposition of citric acid in butter after several points of time.*

Ook hieruit is slechts de conclusie te trekken, dat het citroenzuur zelf voor de vorming van het aroma in de boter bij bewaren geen rol speelt.

In dit verband kan men zich de vraag stellen, of het zin heeft om aan de room een extra hoeveelheid citroenzuur toe te voegen. Eenig effect kan men er wel van verwachten, daar door de hoogere citroenzuurconcentratie ook de vorming van diacetyl tot een wat hoogere waarde plaats vindt, zooals een op 24-6 '44 uitgevoerde proef laat zien.

Aan één portie van 1,7 l room werd 6 gr Natriumcitraat 5 aq opgelost in 50 ml water, welke oplossing gesteriliseerd was, toegevoegd, terwijl aan een tweede portie van dezelfde room niets werd toegevoegd. Beide porties werden gezuurd met zuursel H en op normale tijd verkarnd. Het citroenzuur in de tweede portie was toen bijna geheel omgezet, terwijl in de eerste portie nog zeer veel aanwezig was. De verdere bepalingen bij deze proef waren als volgt:

	Diac. in mg/kg			
	Karnemelk	Versche boter	Boter 5 dg. oud	Boter 8 dg. oud
Zonder citraat .	3,4	1,05	1,5	1,55
Met „ .	4,35	1,55	2,05	2,2

Het aroma der citraatboter was iets sterker, doch dat van de controleboter was reeds ruim voldoende.

Eenig voordeel is er dan ook aan toevoeging van citroenzure zouten aan de room o.i. niet verbonden.

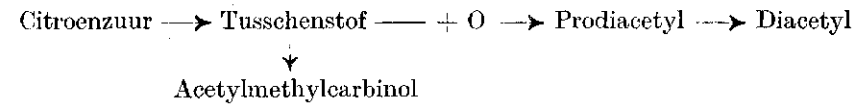
De overmaat blijft werkeloos in de boter achter, hetgeen eerder een nadeel dan een voordeel is te noemen.

Het bij bewaren der boter gevormde diacetyl is dus niet afhankelijk van de in de boter resteerende hoeveelheid citroenzuur. Haar ontstaan hangt slechts samen met de meerdere of mindere inwerking der zuurstof gedurende de omzetting van citroenzuur bij de zuring van de room. Meermalen merkten wij op, dat hoe sterker aerob gezuurd was, d.w.z. hoe hooger het diacetylgehalte der versche boter was, des te sterker was ook de vorming van diacetyl in de boter bij bewaren.

Het is duidelijk, dat de diacetylvorming gedurende de zuring en die gedurende de bewaring van de boter niet twee verschillende processen zijn, maar dat zij beide voortkomen uit hetzelfde proces en dat de één slechts als een nawerking van de ander is op te vatten.

We kunnen geen andere conclusie trekken, dan dat *er bij de inwerking van zuurstof der lucht op een tusschenstof der citroenzuurontleding een stof ontstaat, die bij bewaren der boter langzaam in diacetyl wordt omgezet. Deze stof, waaruit het diacetyl dus rechtstreeks gevormd wordt zullen we het pro-diacetyl noemen.*

Schematisch voorgesteld vindt dus bij de aerobe omzetting van citroenzuur tot diacetyl het volgende plaats:



Deze voorstellingswijze verklaart het beste alle tot nu toe gedane waarnemingen.

De omzetting van tusschenstof in carbinol zal in het algemeen snel plaats vinden. De hoeveelheid pro-diacetyl zal dus in belangrijke mate afhankelijk zijn van de beschikbare hoeveelheid zuurstof. Hoe sterker aerob gekweekt wordt, des te meer pro-diacetyl en des te meer diacetyl zullen we kunnen verwachten.

De oxydatie is een chemische en kan slechts plaats vinden zoolang als er tusschenstof is. Slechts als de omzetting van tusschenstof tot carbinol trager verloopt dan de omzetting van citroenzuur in tusschenstof, kan men ook na de algeheele omzetting van citroenzuur nog invloed van de zuurstof verwachten.

De omzetting van pro-diacetyl tot diacetyl zal, althans in de boter, slechts langzaam geschieden. Slechts op deze wijze is de nog langen tijd voortdurende

vorming van diacetyl in de boter te verklaren. Het is ook mogelijk, dat hierbij nogmaals oxydatie optreedt, maar dit is niet bewezen en zelfs in het reduceerend milieu niet waarschijnlijk.

Bij anaerobe kweeking wordt slechts carbinol gevormd en vooral aanvankelijk veel tusschenstof, waarvan aangenomen moet worden, dat zij storend werkt bij de diacetylbepaling. Daar de oxydatie een chemische is, wordt tevens begrijpelijk dat deze oxydatie niet door de aromabacteriën wordt bewerkstelligd. Dit zijn integendeel reduceerende bacteriën, die het diacetyl tot butyleenglycol reduceeren.

Conclusie

Vatten we de hier medegedeelde onderzoekingen over den invloed van zuurstof op de aromavorming samen, dan kunnen we de volgende, voor de practijk belangrijke, conclusies trekken.

Het gebruik van aromatische (zwak reduceerende) zuursels is alleen niet voldoende om aromatische boter te krijgen, doch het is dan tevens noodzakelijk, dat de zuring aerob geschiedt. Het is niet noodig om een extra hoeveelheid lucht door de room te blazen maar boven de zurende room moet een voldoende hoeveelheid lucht aanwezig zijn om de oxydatie in de oppervlaktelaag tot stand te brengen.

Lage breede zuringstanks zijn dus te prefereeren boven hooge smalle.

De zuring der room zal moeten geschieden tot een tijdstip, dat het in de room aanwezige citroenzuur voor het grootste gedeelte is omgezet. Dit zal in normale gevallen samenvallen met het oogenblik dat ook de zuurheidsgraad voldoende hoog is. De room is dan karnrijp en het is niet aan te bevelen nog langer te wachten met het karnen. Toevoegen van een extra hoeveelheid citroenzuur is onnoodig.

In de room is behalve diacetyl ook pro-diacetyl gevormd, welke met de karnemelk in de boter ingesloten wordt. Het gevormde diacetyl is reeds dadelijk een goede basis voor het aroma, dat echter pas duidelijk optreedt als het ingesloten pro-diacetyl bij het bewaren der boter in diacetyl overgaat. Het zal daarom niet onverschillig zijn voor de mate van het aroma, hoeveel van deze stoffen ingesloten worden. Door technische maatregelen kan men die hoeveelheid grooter of kleiner maken, waardoor men de mate van het aroma naar wensch kan regelen.

IV. DE INVLOED VAN TECHNISCHE MAATREGELEN OP HET AROMA

We hebben gezien hoe bij gebruik van zwak reduceerend zuursel en kweeken aan de lucht, de gezuurde room reeds een belangrijke hoeveelheid diacetyl bevat en daarnaast die stof, die we het pro-diacetyl hebben genoemd, waaruit zich bij bewaren van de boter nog meer diacetyl vormen kan. Het is wel zeker, dat deze stoffen zich voor een belangrijk deel in de waterige phase zullen bevinden, daar althans van het diacetyl bekend is, dat het zeer gemakkelijk in water oplost. Op de vraag, of het zich ook in de vetphase bevindt, komen we nog nader terug.

Het spreekt dus wel vanzelf, dat het voor de sterkte van het aroma van belang is, hoe groot het deel der karnemelkbestanddeelen is dat in de boter ingesloten wordt. Dit nu zal afhangen van de grootte der bij het karnen gevormde boterkorrels (afkarningsgraad), van de mate van uitwasschen van de boterkorrels en mogelijk ook van het kneden. Het ligt dus voor de hand, dat men door deze technische maatregelen nog wel invloed op de mate van het aroma zal kunnen uitoefenen. Wij hebben daarom een aantal proeven uitgevoerd om den invloed van deze maatregelen nader te bestudeeren.

A. De afkarningsgraad

Bij de 2 hierover genomen laboratoriumproeven werd een portie bij 14° C met zuursel H gezuurde room in een groote glazen flesch gekarnd. Na vorming van fijne boterkorrels werd ± 1/3 deel eraf genomen, 2 × gewasschen en gekneed, terwijl hetzelfde geschiedde, toen de korrel door verder te karnen een normale grootte had bereikt en het laatste deel ten slotte zoo grof mogelijk werd afgekarnd. In tabel 19 zijn de resultaten der proeven vereenigd.

Tabel 19 Invloed van de afkarningsgraad op het diacetylgehalte van boter bij laboratoriumproeven.

Proef N°.	Datum	Afkarningsgraad	Versch	Na 1 week bij 13° C		
			Diac. in mg/kg		Geur	Smaak
I	8/2 '44	Fijn *(Small)*	0,5	0,95	z. a	z. a
		Normaal *(Normal)* .	0,8	1,45	ar	ar
		Grof *(Large)*	1,05	2,5	ar	ar
II	23/3 '44	Fijn *(Small)*	0,75	1,3	z. a	z. a
		Normaal *(Normal)* .	0,85	1,8	ar	ar
		Grof *(Large)*	1,25	2,65	ar	ar
Experiment N°.	*Date*	*Size of butter granules*	*Diac. mg/kg*		*Odour*	*Taste*
			Fresh	*After 1 week at 13° C*		

Table 19 *Effect of the degree of churning on the diacetyl content of butter in laboratory experiments.*

De proeven spreken voor zich zelf. Hoe grover de korrel, des te meer diacetyl bevat reeds de versche boter, maar des te hooger wordt ook het diacetylgehalte bij bewaren, ten bewijze dat ook een belangrijke hoeveelheid pro-diacetyl is ingesloten.

Ook een aantal in de boterfabriek der Proefzuivelboerderij genomen proeven vertoonden dezelfden duidelijk uitslag. Tabel 20 geeft een overzicht van deze geheel op dezelfde wijze uitgevoerde proeven.

TABEL 20 Invloed van de afkarningsgraad op het diacetylgehalte van boter bij practijkproeven.

Proef N°.	Datum	Afkarningsgraad	Diac. in mg/kg				Verschil begin- en slotbepaling
			Versch	na dagen			
				1	4—5	7—9	
I	9/6 '42	Fijn *(Small)*	0,75	0,85	1,0	1,2	0,45
		Grof *(Large)*	1,0	1,15	1,5	1,95	0,95
II	1/7 '42	Fijn *(Small)*	0,65		0,9	0,9	0,25
		Grof *(Large)*	1,1		1,55	1,85	0,75
III	13/3 '43	Fijn *(Small)*	0,45			0,9	0,45
		Normaal *(Normal)*	1,0			1,85	0,85
		Grof *(Large)*	1,3			2,35	1,05
IV	20/3 '43	Fijn *(Small)*	0,55			0,95	0,40
		Normaal *(Normal)*	1,0			1,65	0,65
		Grof *(Large)*	1,1			1,9	0,80
Experiment N°.	*Date*	*Size of granules*	*Fresh*	*1*	*4—5*	*7—9*	*Difference between initial and final determination*
				after days			
			Diac. mg/kg				

TABLE 20 *Effect of the degree of churning on the diacetyl content of butter in factory experiments.*

Uit deze proeven volgt duidelijk de stelregel, dat *hoe grover afgekarnd wordt, des te hooger aroma zal de boter verkrijgen*, vooropgesteld dat men aan de andere voorwaarden voor een goede aromavorming heeft voldaan.

Er blijkt echter tevens wel, dat bij normale afkarningsgraad voldoende aroma ontstaat. Voor de practijk, waar men liever niet te veel karnemelkbestanddeelen insluit, geldt dus de regel, dat men *in het belang van een goed aroma een te fijne boterkorrel moet vermijden.*

Hoewel dus uit de voorgaande proeven wel blijkt, dat het insluiten van meer karnemelk tot een hooger diacetylgehalte leidt en de zich in de waterige phase van room en boter bevindende stoffen diacetyl en pro-diacetyl van het grootste belang zijn, willen we toch onze aandacht nog even richten op de vraag of ook het botervet diacetyl bevat. Volgens OVERBY (18) toch zou dit het geval zijn.

Om dit na te gaan, werd in een 3-tal proeven in de boterfabriek, waarbij dezelfde room resp. fijn, normaal en grof werd afgekarnd, het diacetylgehalte niet alleen in de boter, doch ook in het boterserum en het botervet bepaald.

De scheiding tusschen vet en serum geschiedde door uitsmelten der boter bij 45° C en 1 minuut centrifugeeren met 1000 toeren. Het afgepipetteerde botervet werd vervolgens bij 40° C gefiltreerd en het serum werd van de laatste vetresten bevrijd door nogmaals en thans krachtiger te centrifugeeren en na afkoeling in de ijskast de in de buis aanwezige gestolde vetlaag te verwijderen.

Het spreekt vanzelf, dat deze wijze van scheiden niet ideaal is, daar een min of meer langdurige verhitting op 40 a 45° C dient te geschieden. Aan de gevonden cijfers dient dan ook geen groote nauwkeurigheid te worden toegekend.

Niettemin hebben wij uitgerekend, hoeveel diacetyl der boter zich in het vet en hoeveel zich in het serum bevond, aannemende dat de boter uit 85 % vet en 15 % serum bestond.

TABEL 21 Verhouding van het berekende en bepaalde diacetyl in vet en serum bij boter.

Proef N°.	Afkarningsgraad	Diac. mg/kg bepaald in		Berekend diac. mg/kg in			Diac. mg/kg bepaald in
		Serum	Vet	Serum	Vet	Boter	Boter
I	Fijn *(Small)* . . .	2,65	0,65	0,40	0,55	0,95	0,55
	Normaal *(Normal)*	3,1	0,75	0,47	0,64	1,11	1,0
	Grof *(Large)* . . .	3,6	0,65	0,54	0,55	1,09	1,1
II	Fijn *(Small)* . . .	2,7	1,05	0,40	0,90	1,30	1,45
	Normaal *(Normal)*	3,1	1,25	0,46	1,06	1,52	1,45
	Grof *(Large)* . . .	3,95	1,3	0,59	1,11	1,70	2,0
III	Fijn *(Small)* . . .	1,9	1,0	0,29	0,85	1,14	1,2
	Normaal *(Normal)*	3,0	1,45	0,45	1,23	1,68	1,6
	Grof *(Large)* . . .	3,6	2,05	0,54	1,74	2,28	2,6
Experiment N°.	*Size of granules*	*Serum*	*Fat*	*Serum*	*Fat*	*Butter*	*Butter*
		Diac. mg/kg determined		*Diac. mg/kg calculated*			*Diac. mg/kg determined*

TABLE 21 *Proportion of the diacetyl in fat and serum of butter.*

Tabel 21 geeft een overzicht der bepalingen en berekeningen bij de 3 proeven. In de eerste proef werden de bepalingen in versche boter, in de beide andere in boter welke een week bij 13° C bewaard was, verricht.

De conclusie uit deze proeven is, dat het vet per kg minder diacetyl bevat dan het serum, maar dat in een kg boter, die voor 85 % uit vet bestaat, toch *meer diacetyl in het vet aanwezig is dan in het serum.*

Zooals te verwachten was, bevat het serum van grof afgekarnde boter meer karnemelkbestanddeelen dus meer diacetyl dan de andere.

Verder valt dan nog op, dat de 1 week oude boters van proef 2 en 3 een aanmerkelijk hooger diacetylgehalte in het vet hebben dan de versche boter van proef 1, terwijl de gehalten der sera vrijwel gelijk zijn. Men krijgt den indruk, *dat het bij bewaren gevormde diacetyl hoofdzakelijk in het vet wordt opgenomen.*

B. Het wasschen der boterkorrels

Door het wasschen der boterkorrels verwijdert men de aanhangende karnemelkbestanddeelen, welke anders bij het kneden voor een deel in de boter terecht zullen komen. De mate, waarin dit uitwasschen geschiedt, zal ongetwijfeld ook zijn invloed doen gelden op het diacetylgehalte der boter. In tabel 22 worden eenige laboratoriumproeven vermeld. Hierbij geschiedde het wasschen der boterkorrels door ze één of meerdere malen met behulp van een schuimspaan over te brengen in een emmer schoon waschwater. Deze methode kan natuurlijk niet met de in de practijk gebruikelijke vergeleken worden, maar was wel zeer instructief.

Tabel 22. Het effect van wasschen der boterkorrels op het diacetylgehalte der boter

Proef N°.	Datum	Aantal keeren gewasschen	Versch	Na 1 week bij 13° C	Na 1 week bij 13° C	
			Diac.-gehalte in mg/kg		Geur	Smaak
I	1/2 '44	1 ×	1,0	2,25	b. ar	ar
		2 ×	0,65	1,35	ar—	z. a
		3 ×	0,65	1,2	z. a	z. a
II	9/3 '44	1 ×	0,8	1,95	ar	ar
		2 ×	0,65	1,3	ar—	z. a
		3 ×	0,65	1,25	z. a	z. a
Experiment N°.	*Date*	*Number of washings*	*Diac.-content mg/kg*		*Odour*	*Taste*
			Fresh	*After 1 week at 13° C*	*After 1 week at 13° C*	

Table 22 *Effect of the washing of butter granules on the diacetyl content of butter.*

Het is duidelijk, dat door sterk uitwasschen het diacetylgehalte nadeelig wordt beïnvloed en ook het aroma wat minder wordt. In deze proeven was tot op een normale korrelgrootte afgekarnd, waarbij de ingesloten karnemelk

reeds voldoende was om een goed aroma te geven. Het is echter te verwachten, dat bij fijn afkarnen het nadeel van sterk uitwasschen zeker veel grooter is.

Reeds in 1942 was een proef op de boterfabriek genomen, waarbij boterkorrels van normale grootte eenerzijds niet gewasschen en anderzijds normaal resp. sterk gewasschen waren, waarna ze op de gewone wijze verder behandeld waren.

TABEL 23 Invloed van het wasschen der boter op het diacetylgehalte (Proef in de boterfabriek op 12-5 '42).

	Diac. in mg/kg		
	Niet gewasschen	Normaal gewasschen	Extra gewasschen
In versche boter *(Fresh butter)*	1,3	1,15	0,95
Na 4 dagen bij 13° C *(After 4 days at 13° C)*	2,6	2,3	1,75
Na 1 week bij 13° C *(After 1 week at 13° C)*	3,35	2,45	2,1
	Not washed	*Normally washed*	*Strongly washed*
	Diac. mg/kg		

TABLE 23 *Effect of washing the butter granules on the diacetyl content of butter. (Experiments in butter-factory, 12-5 '42).*

Hoewel de diacetylgehalten zeer hoog lagen en alle 3 boters sterk aromatisch waren, is ook hier een invloed van het wasschen duidelijk merkbaar. Van de versche, niet gewasschen en van de versche, extra gewasschen boter werd het diacetylgehalte ook in vet en boterserum bepaald.

	Diac. in mg/kg	
	Niet gewasschen	Extra gewasschen
Boter *(Butter)*	1,3	0,9
Botervet *(Butter-fat)*	0,9	0,7
Boterserum *(Butter-serum)*	3,1	1,55
	Not washed	*Strongly washed*
	Diac. mg/kg	

Uit deze vergelijking is duidelijk te zien, dat door uitwasschen vooral het diacetylgehalte van het serum aanmerkelijk lager wordt, hetgeen ook eigenlijk wel begrijpelijk is.

C. De invloed van het kneden der boter op het diacetylgehalte

De normaal gewasschen boter van de hiervoor beschreven proef in de boterfabriek van 12/5 '42 werd nog verdeeld in 2 porties, die respectievelijk 8 en 34 slagen gekneed werden op de eenvoudige kneedinstallatie van de boterfabriek.

In beide gevallen bedroeg het diacetylgehalte der versche boter 1,15 mg en der 1 week bij 13° C bewaarde boter 2,45 mg. Verschil tusschen geur en smaak der porties kon niet worden geconstateerd.

Een dergelijke proef werd op 2/6 '42 nog eens herhaald met de volgende uitkomst:

Kneden *(working)*	10 ×	30 ×
Diac. mg/kg. Versch *(Diac. mg/kg. Fresh)* . . .	1,1	1,1
„ „ Na 1 dag („ „ *After 1 day*)	1,35	1,3
„ „ „ 4 dagen („ „ „ *4 days)*	1,7	1,6
„ „ „ 7 „ („ „ „ *7 „*)	1,9	1,8

Wederom was er geen reëel verschil, ook niet in geur en smaak.

In een drietal laboratoriumproeven werd nogmaals hetzelfde geconstateerd. De boters, bereid met de aromatische zuursels H en W., werden op normale korrelgrootte afgekarnd. Het kneden geschiedde op een houten kneedtafeltje met een handrol, waarbij onder 1 × kneden verstaan werd het plaatsen der kneedrol in het midden der kluit, vervolgens naar voren en dan geheel naar achter rollen der kneedrol. Tabel 24 geeft een overzicht der resultaten.

Tabel 24 De invloed van het kneden der boter op het diacetylgehalte.

Proef	Datum	Zuursel	Kneden	Versch	Na 1 week bij 13° C		
				Diac. mg/kg		Geur	Smaak
I	3/2 '44	H	10 ×	0,5	1,35	ar—	ar—
			20 ×	0,75	1,45	ar—	ar—
			30 ×	0,7	1,4	ar—	ar
II	2/3 '44	W	10 ×	0,75	1,35	ar	ar—
			20 ×	0,75	1,25	ar	z. a
			30 ×	0,7	1,3	ar—	ar—
III	28/3 '44	H	10 ×	1,05	1,7	ar	ar—
			30 ×	0,85	1,55	ar—	z. a
Experiment N°.	*Date*	*Starter*	*Working*	*Diac. mg/kg*		*Odour*	*Taste*
				Fresh	*After 1 week at 13° C*		

Table 24 *Influence of working the butter on the diacetyl content.*

Uit alle genomen proeven is slechts één conclusie te trekken, n.l. dat *het korter of langer kneden op het aroma resp. het diacetylgehalte der boter van geen invloed is.*

V. CONCLUSIES VOOR DE PRACTIJK

Hoewel nog tal van kanten aan het aromavraagstuk een nadere bestudeering wenschelijk maken, zijn wij van meening, dat wij het hoofddoel dat wij ons gesteld hebben, het aroma aan boter bewust te kunnen regelen, na tientallen jaren van veelomvattende proefnemingen bereikt hebben. Daar het voor de practijk moeilijk is uit de veelheid der gegevens conclusies te trekken, geven wij hieronder een korte samenvatting in punten over de wijze, waarop volgens onze meening de aromavorming geschiedt, de voorwaarden, waaraan voor een doelbewuste regeling van het aroma moet worden voldaan en de methoden volgens welke men de mate van het aroma kan regelen.

Ontstaanswijze

1. De aromavorming wordt bewerkstelligd door de in 1917 door Boekhout en Ott de Vries ontdekte *aromabacterien*. Zij doen dit echter slechts in *zuur milieu*, b.v. in melk of room, welke door melkzuurbacteriën van het type Sc. lactis of Sc. cremoris gezuurd is.

2. De belangrijkste geurstof, die gevormd wordt, is het *diacetyl*, een niet bestendige stof, die bij *reductie* in *geurlooze verbindingen* kan overgaan.

3. De bron, waaruit het aroma gevormd wordt, is het normaal in melk of room aanwezige *citroenzuur*. De hoeveelheid hiervan is *voldoende* om in boter een krachtig aroma te kunnen doen ontstaan.

4. Het diacetyl ontstaat omdat tijdens de omzetting van het citroenzuur door de aromabacteriën, dus *gedurende de rijping* van zuursel of room, de *zuurstof van de lucht* oxydeerend werkt aan de oppervlakte van de cultuur.

Uit het daarbij gevormde *oxydatieproduct* (*pro-diacetyl*) vormt zich tijdens het zuren, doch *ook later in de boter* het diacetyl (boteraroma).

Vooewaarden

1. Het is noodzakelijk, dat de bereide boter slechts weinig vreemde micro-organismen, in het bijzonder *weinig gisten* bevat, daar deze het gevormde aroma weer vernietigen.

2. De zuring dient *aan de lucht* te geschieden. De in Nederland gebruikelijke wijzen van zuren, ook die in gesloten tanks, is voor het contact met de zuurstof der lucht *voldoende te achten* om naar wensch aromatische boter te bereiden.

3. Het is gebleken, dat de *kwaliteit van het zuursel* de *aromavorming* in de boter *in hooge mate beinvloedt*. Indien geen of te weinig aromabacteriën aanwezig zijn, ontstaat boter met een gore afwijkende smaak.

Indien de aromabacteriën te veel de overhand hebben ontstaat eveneens boter met afwijkende smaak.

Slechts indien het evenwicht tusschen melkzuurbacteriën en aromabacteriën goed is, kan goede boter worden bereid en het aroma naar wensch worden geregeld. Een goed zuursel dient dus te bestaan uit een evenwichtige samenstelling van een aantal melkzuurbacteriën en aromabacteriën, waarvan de eersten de room op een goeden zuurgraad brengen en de laatsten de mate van aromavorming beheerschen.

Men kan de goede zuursels dan nog onderscheiden in:

a. Zuursels met sterk reduceerende aromabacterien,

waarmede slechts neutrale boter is te bereiden

en

b. Zuursels met zwak reduceerende aromabacterien,

die voor de bereiding van aromatische boter gebruikt moeten worden.

4. *Controle* op het zuursel is eenvoudig uit te voeren door de z.g. *kreatine-proef* (aromaproef).

Bij deze proef wordt in een bij ± 20° C gekweekt, met 0,5 % geënt zuursel na 24, 48 en 72 uur de kreatinereactie uitgevoerd.

Bij evenwichtige zwak reduceerende zuursels zal deze kreatinereactie 3 × positief zijn (roode kleur).

Bij evenwichtige sterk reduceerende zuursels zal de reactie de eerste dag positief zijn, doch de 2e en 3e dag negatief.

Beide soorten zuursel worden door het *Rijkslandbouwproefstation te Hoorn* op aanvraag verstrekt.

Bij niet evenwichtige zuursels zal de kreatinereactie op de eerste dag negatief of hoogstens zeer zwak zijn.

Methoden

1. *Neutrale*, doch overigens zeer goede boter kan men bereiden door te zuren met een evenwichtig, doch *sterk reduceerend zuursel* (neutraal zuursel). Bijzondere maatregelen behoeven verder niet genomen te worden. Vrijwel neutrale boter verkrijgt men ook bij gebruik van aromatisch zuursel, indien zeer fijn afgekarnd en sterk uitgewasschen wordt.

2. *Aromatische boter* kan slechts bereid worden door te zuren met een *zwak reduceerend zuursel* (aromatisch zuursel).

Er moet bijzonder op gelet worden, dat het zuursel *niet geïnfecteerd* wordt met vreemde micro-organismen, met sterk reduceerende aromabacteriën (ter contrôle de kreatineproef uitvoeren), of bacteriophagen (contrôle op de zuring). Het aanhouden van een *moederzuursel* moet noodzakelijk worden geacht.

3. De *mate* van het *aroma* kan worden geregeld door de *wijze van afkarnen* en het uitwasschen der boter.

a. Bij grof afkarnen en niet uitwasschen ontstaat *sterk aromatische boter.*

b. Bij normaal afkarnen en matig uitwasschen ontstaat *goed aromatische* boter.

c. Bij fijn afkarnen en sterk uitwasschen ontstaat vrijwel *neutrale tot zwak aromatische boter.*

Met deze richtlijnen voor oogen is het mogelijk het aroma naar wensch te regelen, zoodat door elke fabriek afzonderlijk de *beste wijze van werken* kan worden bepaald.

SAMENVATTING

Voor de vorming van aroma in gezuurde, niet gezouten boter zijn van belang:

1°. de aard van het bij de roomzuring gebruikte zuursel,

2°. de aanwezigheid van zuurstof gedurende de zuring,

3°. de techniek van de bereiding, in het bijzonder de wijze van afkarnen en het uitwasschen van de boter.

Daar het vermogen van aromabacteriën om diacetyl te reduceeren tot acetylmethylcarbinol, respectievelijk butyleenglycol zeer verschillend is, kan men zuursels onderscheiden in sterk reduceerende (neutrale) en zwak reduceerende (aromatische) zuursels. Deze onderscheiding kan worden gemaakt door de kreatineproef, een proef waarmede hoofdzakelijk acetylmethylcarbinol wordt aangetoond, uit te voeren in zuursels, respectievelijk 24, 48 en 72 uur na de enting, daar de reductie van het diacetyl parallel verloopt met die van het acetylmethylcarbinol (tabel 1, 2, 3 en fig. 1). Bij zwak reduceerende zuursels is de uitslag der kreatinereactie 3 maal positief, bij sterk reduceerende zuursels, de eerste dag meestal nog positief, doch de tweede en derde dag negatief. Het zuursel moet bij deze proef met 0,5 % worden geënt en bij 20° C worden bewaard.

Het bleek onmogelijk, om met sterk reduceerende zuursels aromatische boter te bereiden, terwijl dit daarentegen met zwak reduceerende zuursels wel kon worden bewerkstelligd.

Dit feit werd geconstateerd zoowel in laboratoriumproeven als bij proefnemingen in de boterfabriek der Proefzuivelboerderij (zie tabel 4 en 5). Ook bij een in de practijk uitgevoerde proef werd dit verschil in invloed op de boter tusschen sterk en zwak reduceerende zuursels bevestigd.

De invloed van de zuurstof van de lucht op de aromavorming in boter werd in eenige proeven met aerobe resp. anaerobe zuring en karning nog eens duidelijk gedemonstreerd (tabel 8).

Hoewel aanvankelijk ook bij anaerobe zuring een stof gevormd wordt, die in de diacetylbepaling als diacetyl reageert, verdwijnt deze tusschenstof spoedig (fig. 2).

Het diacetyl vormt zich dan ook hoofdzakelijk in de oppervlaktelaag van het zuursel (tabel 11). Hoe grooter de aan de lucht blootgestelde oppervlaktelaag is, des te hooger is ook het diacetylgehalte (tabel 12).

In overeenstemming hiermede leidt ook het doorvoeren van steriele lucht door een zuursel gedurende de zuring tot een hooger gehalte aan diacetyl (tabel 13). Het effect van het in aanraking brengen met lucht door karnen, schudden of lucht doorleiden is vooral groot, indien er nog citroenzuur in de cultuur aanwezig is (tabel 14 en 16, fig. 4).

Aangezien de oxydatie tot diacetyl binnen korten tijd tot stand gebracht kan worden (zie o.a. tabel 15), moeten we aannemen, dat het een zuiver chemische oxydatie is. De stof, waaruit diacetyl door oxydatie ontstaat, is niet het acetylmethylcarbinol omdat door schudden van deze stof met lucht geen diacetyl kan worden gevormd. Ook het pyrodruivenzuur, aceetaldehyde en methylglyoxaal worden door schudden met lucht niet tot diacetyl geoxydeerd.

In aromatische boter ontwikkelt zich het aroma na verloop van eenige dagen. De bij de bereiding ingesloten karnemelk geeft de versche boter reeds een zeker diacetylgehalte, doch dit neemt bij bewaren der boter aanmerkelijk toe. Ook voor deze toename is een aerobe zuring der room noodzakelijk. Verondersteld werd daarom, dat gedurende de zuring door chemische oxydatie van een tusschenstof der citroenzuurontleding niet direct diacetyl gevormd wordt, maar een andere tusschenstof (pro-diacetyl), die ingesloten in de boter langzaam ontleedt tot diacetyl. Na de bereiding van de boter is de ontleding van het pro-diacetyl, hetgeen waarschijnlijk geen oxydatieproces is, nog niet afgeloopen, zoodat de vorming van diacetyl in de boter wordt voortgezet.

Aangezien de omzetting van citroenzuur in boter spoedig tot stilstand komt (tabel 18), is het voor de aromavorming het beste, indien het karnen plaats vindt nadat het citroenzuur in de room vrijwel geheel is omgezet (tabel 17). Bij een goed zuursel zal dit moment samenvallen met het moment, waarop de juiste zuurgraad is bereikt. Een extra toevoeging van citroenzuur aan de room is voor het verkrijgen van goed aromatische boter in 't geheel niet noodzakelijk.

Aangezien door grover afkarnen meer diacetyl en pro-diacetyl in de boter ingesloten wordt, is het begrijpelijk, dat grover afkarnen tot een sterker aromatische boter leidt (tabel 19 en 20).

Het diacetyl bevindt zich voor een belangrijk deel in het vet der boter (tabel 21) vooral bij 1 week oude boter.

Door wasschen der boterkorrels wordt een deel van het serum verwijderd, zoodat intensiever uitwasschen het aroma van de boter doet verminderen (tabel 22 en 23).

Het kneden der boter heeft daarentegen geen invloed op de vorming van diacetyl in de boter (tabel 24).

Tenslotte werden een aantal richtlijnen voor de practijk opgesteld om de sterkte van het aroma aan de boter naar wensch te regelen.

THE MANUFACTURING OF AROMATIC BUTTER

Important factors for the formation of aroma in unsalted butter from soured cream are:

1. the kind of starter used.
2. the presence of oxygen during the souring of the cream.
3. the way of churning and washing the butter.

Since the ability of aromabetacocci to reduce diacetyl to acetylmethylcarbinol and 2—3 butylene glycol is rather variable it is possible to divide starters into strongly reducing (neutral) and weakly reducing (aromatic) ones. This division can be made by applying the creatin-test, which is mainly a test for acethylmethylcarbinol, to starters, for three times, viz. one, two and three days after inoculation with 0.5 % and incubating at 20° C. because the reduction of diacetyl correlates with that of acetylmethylcarbinol (tables 1, 2, 3 and fig. 1).

With weakly reducing starters the creatin-test is three times positive, while with strongly reducing starters this reaction, though often positive on the first day, is always negative on the second and third day.

It appeared from our experiments that it was impossible to obtain aromatic butter, when a strongly reducing starter was used, whereas with a weakly reducing starter this could readily be done. This fact was stated in laboratory experiments as well as in the small butter-factory of the Dairy Experimental Farm (tables 4 and 5).

In a large butter-factory the difference between the influence of neutral and aromatic starters on the formation of aroma in butter could also be convincingly demonstrated.

The effect of the oxygen of the air on the formation of aroma in butter was once more clearly proved in some experiments with aerobic and anaerobic souring and churning (table 8).

Although at first with anaerobic souring too, a substance is formed which reacts as diacetyl in the determination of diacetyl, this intermediate substance disappears soon (fig. 2).

The diacetyl is formed mainly in the surface layer of the starter (table 11). The greater the surface of the starter, the higher the percentage of diacetyl (table 12).

In accordance herewith the leading of sterile air through a starter also results in a higher percentage of diacetyl (table 13). The effect of bringing the culture into contact with air by churning, shaking or leading air into it, is greatest when citric acid is still present in the culture. (tables 14 and 16, fig. 4).

Since the oxidation to diacetyl can be accomplished within a short time (see for instance table 15), we must assume that the oxidation is a mere chemical one.

The intermediate substance, from which diacetyl is formed, is not acetylmethylcarbinol. We stated this already in a previous paper and it could be proved again, because by shaking with air, acetylmethylcarbinol is not oxidized to diacetyl.

Neither is diacetyl formed, when shaking pyruvic acid, acetaldehyde and methylglyoxal with air.

In aromatic butter the aroma develops in the course of a few days. The buttermilk, included in the granules, gives the fresh butter a certain percentage of diacetyl, but when the butter is stored, this percentage will increase considerably. It was demonstrated that for this increase in the butter it was also necessary that the cream had been soured in presence of air. It was therefore supposed that during the souring of the cream, an intermediate substance of the citric acid decomposition is not oxidized to diacetyl itself, but to another substance (pro-diacetyl), from which diacetyl is formed slowly. After the manufacture of the butter the decomposition of the pro-diacetyl, which probably is not an oxidation process, is not yet finished and continues in the butter.

Since the decomposition of citric acid in butter soon comes to a standstill (table 18), churning of the cream must take place after the citric acid has almost totally been decomposed (table 17). With a good starter this point of time will correspond with the moment at which the acidity of the cream is sufficiently high. An addition of citric acid to the cream is not at all necessary in order to obtain aromatic butter. As a result of churning to a larger granule, the butter includes more diacetyl and pro-diacetyl. This leads to more aromatic butter (table 19 and 20).

The fat of the butter contains an important part of diacetyl, especially when the butter has been stored for a week (table 21).

By washing the buttergranules, part of the buttermilk is removed, so that a more thoroughly washing will decrease the diacetylcontent of the butter (table 22 and 23).

Working the butter, on the other hand, has no influence on the quantity of diacetyl (table 24).

Finally some advice was given for the practice, how to regulate at will the strength of the aroma in the butter.

LITERATUUR

1. J. VAN BEYNUM, J. W. PETTE. *Versl. landb. onderz.* **44C** (1938) 207. Idem. *J. dairy res.* **10** (1939) 250.
2. C. R. BREWER, C. H. WERKMAN. *Anth. v. Leeuwenhoek* **6** (1940) 110.
3. H. D. SLADE, C. H. WERKMAN. *J. Bact.* **40** (1940) 158.
4. A. J. OVERBY. Den. Kgl. Vet.- og Landbohöjskole. Aarsskrift (1946) p. 33.
5. A. J. VIRTANEN, P. KONTIO, T. STORGÅRDS. *Biochem. Z.* **307** (1940) 245.

5a. A. J. VIRTANEN. *Z. angew. Chem.* **54** (1941) 491.

6. A. J. VIRTANEN. XI Milchwirtsch. Weltkongress Berlin **2** (1937) 121.
7. H. D. SLADE, C. H. WERKMAN. *J. Bact.* **41** (1941) 675.
8. T. STORGÅRDS. *Molk. wiss. Ztg.* **2** (1940) 22.
9. J. VAN BEYNUM, J. W. PETTE. *Versl. landb. onderz.* **47C** (1941) 101.
10. E. A. PRILL, B. W. HAMMER. *Iowa State Coll. J. Sci.* **12** (1938) 385.
11. M. B. MICHAELIAN, B. W. HAMMER. *Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **205** (1936).
12. C. R. BREWER, C. H. WERKMAN, M. B. MICHAELIAN, B. W. HAMMER. *Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* **233** (1938).
13. E. A. PRILL, B. W. HAMMER. *J. dairy Sci.* **22** (1939) 67.
14. A. J. VIRTANEN, J. TARNANEN. *Suomen Kemistilehti* **9** (1936) 2.
15. H. SCHMALFUSZ, H. WERNER. *Fette u. Seifen* **44** (1937) 509.
16. E. SIMON, C. NEUBERG. *Bioch. Z.* **232** (1931) 479.
17. C. NEUBERG, E. HOFMANN. *Bioch. Z.* **224** (1930) 491.
18. A. J. OVERBY. *Maelkeritidende* Nr. 47, 48, 49 (1942).