RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN

ONDERZOEKINGEN OVER ZURING EN AROMAVORMING BIJ PRACTIJKZUURSELS, IN GEBRUIK BIJ DE BOTERBEREIDING, EN METHODEN VAN ONDERZOEK VAN ZUURSELS

DOOR

J. VAN BEYNUM EN J. W. PETTE

(Ingezonden 4 Maart 1941)

INLEIDING

Bij de boterbereiding dient het zuursel om den room te doen rijpen, d.w.z. zulke veranderingen te doen plaats hebben, dat de uit den gerijpten room verkregen boter den typischen geur en smaak bezit, welke eigen is aan goede boter, die uit gepasteuriseerden en daarna gezuurden room bereid wordt.

Het is niet gemakkelijk om te oordeelen over de bruikbaarheid of de kwaliteit van een zuursel. In de practijk beoordeelt men een zuursel naar geur en smaak, uiterlijk (slijmig, fluweelig, brokkelig, waarvan de uitersten ook wel „lang" en „kort" genoemd worden; weiafscheiding) en tijdsverloop binnen welk bij overenten in gepasteuriseerde melk de zuurstremming optreedt of de hoeveelheid zuur, welke in een bepaalden tijd na overenten in gepasteuriseerde melk ontstaan is.

Een rationeele onderzoekmethode, waarbij op grond van onze kennis en inzichten in het rijpingsproces een oordeel over de eigenschappen van een boterzuursel geveld kan worden, bestaat niet. Het zou inderdaad wenschelijk zijn zoo een methode te bezitten, daar het zuursel bij de boterbereiding van groot belang is en dus niet goed genoeg kan zijn, terwijl anderzijds vele zuursels op grond van uiterlijke beoordeeling voor het gebruik afgekeurd worden, hoewel dit niet noodig zou zijn. Verder zou een rationeele methode van zuurselonderzoek ons de mogelijkheid bieden te bepalen of zekere zuursels in staat zijn het *roomrijpingsproces* in zekere *richting* te drijven. We denken hierbij b.v. aan de bereiding van boter met krachtig en met zwak aroma.

Bij een boterzuursel onderscheiden wij 2 processen, nl. het zuringsproces en het aromavormingsproces. Er moet als eisch gesteld worden, dat de zuring van den room met de gewenschte snelheid verloopt. De *zuringssnelheid* is

dus een factor van groot belang [1]). Boterzuursel moet bovendien de typische boteraromastoffen kunnen produceeren. De zuring wordt veroorzaakt door de melkzuurbacteriën, de aromavorming door de aromabacteriën. Zal dus de zuringssnelheid afhangen van de eigenschappen der melkzuurbacteriën, de aromavorming berust op de eigenschappen der aromabacteriën. Daar echter de productie der boteraromastoffen gebonden is aan de zuurvorming in den voedingsbodem, bestaat de mogelijkheid, dat op de aromavorming ook de eigenschappen van de in het zuursel aanwezige melkzuurbacteriën invloed hebben.

De wederzijdsche beïnvloeding van deze twee bacteriesoorten maakt juist een studie van zuursels zoo moeilijk. Nadat wij de voorwaarden en omstandigheden der aromavorming door laboratoriumproeven hadden bestudeerd en tot een inzicht waren gekomen over de levensprocessen der aromabacteriën (1) meenden wij goed te doen dit inzicht te toetsen aan een aantal practijkzuursels en daarbij tevens het bovengenoemde doel, een rationeele onderzoekmethode, na te streven. Wij hebben daartoe 65 practijkzuursels onderzocht, welke wij mochten ontvangen dank zij de bereidwillige medewerking van den Bond van op coöperatieven grondslag werkende zuivelfabrieken in Noord-Holland en den Bond van coöperatieve zuivelfabrieken in Friesland. Daar in den loop van dit onderzoek onze onderzoekingstechniek naar behoefte gewijzigd werd, kunnen wij de zuursels niet bespreken van één gezichtspunt uit, doch verdeelen ze, vooral in de hoofdstukken over de aromavorming, in groepen.

A. DE ZURINGSEIGENSCHAPPEN

De in Nederlandsche zuursels werkzame melkzuurbacteriën behooren tot het type Streptococcus lactis of -cremoris. Volgens Deensche onderzoekingen zou speciaal Sc. cremoris de voor boterzuursels geschikte melkzuurbacterie zijn. Hoewel wij van meening zijn, dat de eenige taak der melkzuurbacteriën in een zuursel de zuurvorming is (waarvan ook de aromabacteriën profiteeren) en dat dus Sc. lactis als even bruikbaar beschouwd moet worden, vonden ook wij vroeger (2) in zuursels hoofdzakelijk Sc. cremoris.

Hoe kan men nu de zuringssnelheid van een zuursel bepalen?

Indien men een zuurselverdunning in steriel water uitzaait op Weigelatine, zoodat een oppervlaktekoloniëncultuur ontstaat en men ent na 4 dagen kweeken bij 21° C een aantal koloniën af in gesteriliseerde centrifugemelk,

[1]) Wij spreken liever over zuringssnelheid dan over zuringsvermogen, daar onder dit laatste begrip ook verstaan kan worden de maximale hoeveelheid zuur, welke ontstaan kan. Hoewel deze van belang kan zijn voor het behouden blijven van het aroma in zuursels, is zij van geen belang voor de snelheid, waarmede een zuursel zuurt.

(2) C 2

dan vindt men, dat sommige koloniën de centrifugemelk (in buizen met 10 ml) bij 21° C door zuurvorming doen stremmen in 1 etmaal, andere binnen 2 etmalen, enz. tot 7 etmalen toe. Hierin werd een methode gezien om de zuringssnelheid van een zuursel te bepalen. Zou men nl. een groot aantal koloniën en wel ieder type naar verhouding van het aantal daarvan op de plaat voorkomende koloniën van de Weigelatineplaten in centrifugemelk afenten en dan bepalen, hoeveel van deze cultures na verschillende tijden gestremd zijn, dan werd gemeend, dat een zuursel, dat onder zijn zuurvormende bacteriën meer snelle stremmers bezit dan een ander zuursel, ook in zijn geheel sneller zou zuren. Dit nu zal ongetwijfeld wel juist zijn in uiterste gevallen. Inderdaad zal een zuursel, waarbij van de 25 afgeënte koloniën 20 zuurvormers zijn, die de melk in 2 etmalen stremmen, sneller zuren dan een zuursel, waarvan de 20 zuurvormers de melk eerst binnen 4 of 5 etmalen stremmen. Doch dergelijke uitersten treft men bij zuursels niet aan. Men vindt allerlei gradaties zooals uit tabel 1 moge blijken. In deze tabel is vermeld hoeveel percent van

TABEL 1

	Percentage afgeënte koloniën, dat centrifugemelk bij 21° C stremt na						
	1 dag	2 dagen	3 dagen	4 dagen	5 dagen	6 dagen	7 dagen
Zuursel 10	36	50	7	7	—	—	—
„ 32	2	72	13	4	4	2	2
„ 35	28	37	25	8	—	2	—
„ 19	24	33	43	—	—	—	—
„ 8	5	52	38	—	5	—	—
„ M 1	4	50	8	38	—	—	—
„ 12	17	30	22	30	—	—	—
„ 46	9	38	38	3	9	3	—
„ 49	15	26	46	5	3	3	3
„ 42	7	34	27	7	10	15	—
„ 4	14	17	50	29	—	—	—
„ 30	3	28	42	11	8	5	3
„ 14	17	6	56	22	—	—	—
„ 31	6	17	31	15	17	4	10
„ 27	2	6	32	19	38	2	—
„ 37	3	—	72	18	7	—	—
Zuursel 22	—	90	10	—	—	—	—
„ 5	—	55	15	20	5	5	—
„ 17	—	33	40	27	—	—	—
„ 2	—	25	58	8	8	—	—
„ 53	—	25	17	33	15	—	—
„ 7	—	12	44	31	6	6	—
„ 51	—	3	86	6	—	—	—
Zuursel 40	—	—	93	7	—	—	—

de zuurvormers de centrifugemelk na resp. 1, 2, 3, ... 7 etmalen stremden. Daar de 3- en meerdaagsche stremmers als van minder goede kwaliteit beschouwd kunnen worden, zijn de voor de tabel gekozen zuursels gerangschikt volgens afnemende percentages 1- en 2-daagsche stremmers samen.

Het is niet wel doenlijk om uit dergelijke reeksen te bepalen welk zuursel de snelste zuring zal vertoonen, omdat wij niet den invloed van iedere groep in het mengsel apart kunnen bepalen en zeker niet naar hun percentisch voorkomen. Nu heeft een systeem als dit het nadeel, dat men betrekkelijk willekeurige scheidingsgrenzen aanneemt, zooals hier 24, 48, 72 enz. uren gekozen werden. Er zullen b.v. bij de driedaagsche melkzuurbacteriën stammen zijn, die de zuurstremming na 52 uur vertoonen, andere, die het na 70 uur doen. Deze worden beide tot de driedaagsche gerekend, hoewel de eerstgenoemde toch beter bij de tweedaagsche gerekend zouden kunnen worden. Wij hebben daarom ook bij enkele zuursels kleinere intervallen genomen, doch ook hiermede werd geen duidelijker beeld gekregen.

Het bleek, dat alle zuursels zeer heterogeen van samenstelling waren. Men vindt, op een enkele uitzondering (b.v. zuursel 40) na, steeds melkzuurbacteriën van zeer verschillende zuringssnelheid.

In de bacteriologie wordt veelal de kunstmatige reincultiveering als een nadeel beschouwd, omdat de bacteriën daarbij geschaad zouden kunnen worden. Bij de toegepaste methode worden de verschillende bacteriën ook onderworpen aan een reincultiveering, zoodat dit bezwaar ook hier zou kunnen gelden. Wij hebben daarom nagegaan of na verschillende overentingen de zuringssnelheid der geïsoleerde bacteriën constant bleef of niet. Daartoe werden b.v. van de verkregen en herhaaldelijk overgeënte culturen weer koloniënculturen aangelegd op Weigelatine en hiervan na 3 à 4 dagen kweeken bij 21° C 25 koloniën afgeënt en op dezelfde wijze beoordeeld. Wij vonden b.v.

bij een 1-daagsche melkzuurbacterie 96 % 1-daagsche en 4 % 2-daagsche,
bij een 2-daagsche melkzuurbacterie 4 % 2-daagsche en 96 % 3-daagsche,
bij een 3-daagsche melkzuurbacterie 88 % 3-daagsche en 12 % 4-daagsche,
bij een 4-daagsche melkzuurbacterie 56 % 4-daagsche en 44 % 5-daagsche.

Bij een nog latere herhaling met dezelfde stammen gaf
de 1-daagsche 100 % 2-daagsche,
de 2-daagsche 8 % 3-daagsche en 92 % 4-daagsche,
de 3-daagsche 100 % 3-daagsche,
de 4-daagsche 12 % 4-daagsche en 88 % 5-daagsche.

In een ander geval werden bij afenting van een Weigelatineplaat, geënt met een ééndaagsche melkzuurbacterie, slechts driedaagsche gevonden. Bij

deze methode van onderzoek kan men er dus niet zeker van zijn, dat van iedere afgeënte kolonie de waargenomen stremmingstijd een juist beeld van de zuringssnelheid geeft.

Verder moet nog als bezwaar tegen een dergelijk beoordeelingssysteem aangevoerd worden, dat het zeer moeilijk is de verschillende bacteriestammen, welke op de Weigelatineplaten aan hun kolonietype onderscheiden kunnen worden, in de juiste verhouding, waarin zij voorkomen, af te enten.

Wij moeten dus tot de conclusie komen, dat de afentingsmethode niet geschikt is om een oordeel over de zuringssnelheid van een zuursel te geven.

Wij hebben vervolgens naar een methode van meer directen, practischen aard gezocht en getracht door titreeren van centrifugemelk, welke geënt was met een nauwkeurig afgemeten hoeveelheid van het te onderzoeken zuursel en bij een bepaalde temperatuur bewaard werd, een indruk van de zuringssnelheid te krijgen.

De zuringskromme, welke het verband aangeeft tusschen zuurproductie en tijdsverloop na de enting, is een S-vormige lijn, waarvan het eerste deel veel op een logarithmische lijn gelijkt. Theoretisch wijkt zij voor het geval van een reincultuur hiervan weinig af en zou de helling dezer lijn bepaald worden door de snelheid, waarmede de melkzuurbacteriën zich vermenigvuldigen. Men zou nu door een titratie, na een bepaalden tijd uit te voeren, zich een denkbeeld kunnen vormen van de snelheid der zuurvorming, zooals men dit in de practijk b.v. doet door het zuursel ongeveer 20 uren na de enting te titreeren. De zuring heeft dan echter het bovenste deel der S-lijn bereikt, waar de titer van het zuursel maar langzaam met den tijd verandert en dus nooit groote verschillen gevonden worden. Men kan dus beter een oogenblik kiezen, waarop de zuring nog met groote snelheid voortschrijdt. Doch tegen het uitvoeren van één titratie bestaat bezwaar. De S-lijn der zuring kan nl. in verschillende onderdeelen gesplitst worden. Men onderscheidt (fig. 1):

A, de rustperiode, gedurende welke de bacteriën nog niet tot deeling overgaan en welke valt in een langer of korter tijdvak direct na de enting;

B, het gebied van den logarithmischen groei, waarin de zuurvorming eerst onmerkbaar is en steeds sneller (ook bijna logarithmisch) toeneemt;

C, het gebied der zuurvormingsvertraging, het bovenste deel der S-lijn, gevolgd door een tijd van zuurvormingsstilstand, D.

Van de z.g. rustperiode (Engelsch: lag phase) is niet zooveel bekend. De duur van deze periode is ook zeer moeilijk te bepalen. Bij vroegere onderzoekingen (3) werd bij reinculturen van melkzuurbacteriën geen rustperiode

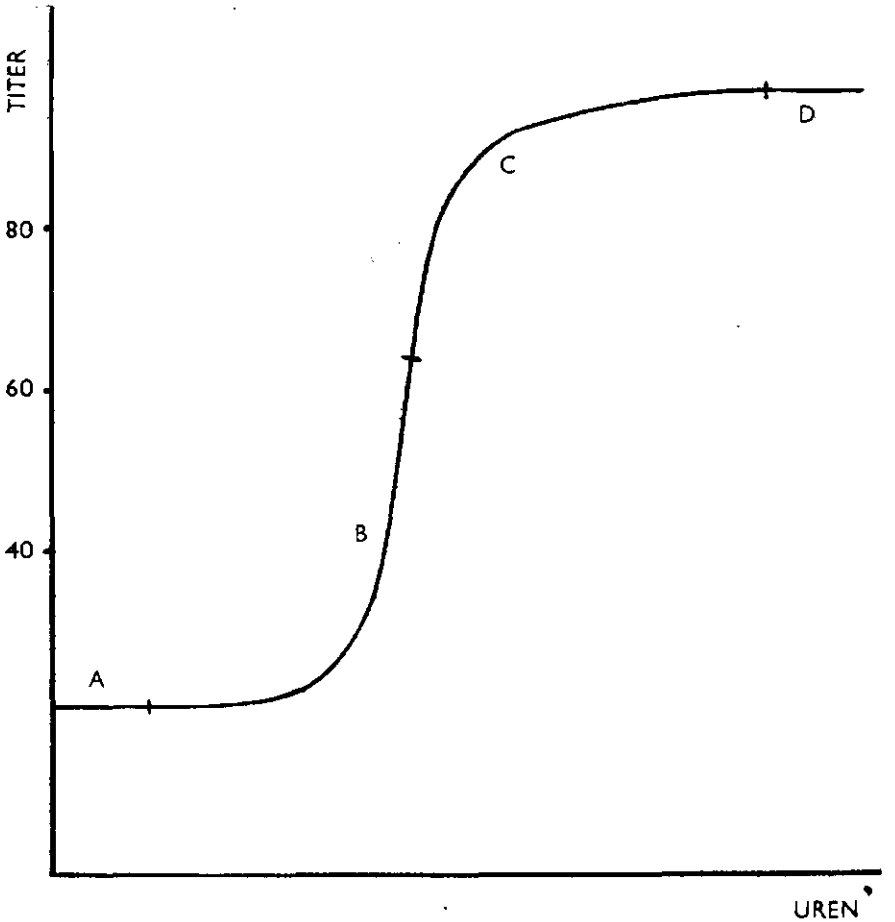


Fig. 1

Titerverloop bij een zuursel

gevonden, doch het betrof hier melkzuurbacteriën, die dagelijks overgeënt werden in melk van hetzelfde bedrijf. Anders wordt het bij zuursels van vreemde herkomst. Meestal vindt de enting van deze zuursels plaats op een tijdstip, waarop de maximum zuurtiter reeds bereikt was en de bacteriën dus in werkloozen toestand waren. Bovendien blijkt herhaaldelijk hoe gevoelig zuursels zijn bij overbrenging van het eene bedrijf naar het andere. Mogelijk staat deze gevoeligheid in verband met de eigenschappen der melk. Bij zuursels van vreemde herkomst zullen wij dus wel rekening moeten houden met een rustperiode en daarom kunnen wij niet volstaan met de bepaling van één titercijfer na een zeker tijdsverloop, omdat een verschil in titer met een ander

zuursel op dat tijdstip niet aan een verschil in zuringssnelheid geweten behoeft te worden, maar veroorzaakt kan zijn doordat de rustperiode bij het eene zuursel langer was dan bij het andere.

Daar nu bij het gewone dagelijksche gebruik van een zuursel de overenting geschiedt als de periode der zuurvormingsstilstand nog niet of pas bereikt is en daarbij dus levenskrachtige bacteriën overgeënt worden in melk, die van dag tot dag niet veel verschilt, meenen wij, dat de rustperiode voor de practijk niet van veel belang kan zijn. Het komt er dus bij het onderzoek van zuursels op aan de werkelijke zuringssnelheid te bepalen, dat is dus tijdens de periode, waarin de bacteriën hun krachtigste werkzaamheid ontplooien, nl. de periode van den logarithmischen groei. Om echter de zuringssnelheid uit te drukken in een getal, berekend uit den loop der zuringscurve in dit traject van den logarithmischen groei, is een zorgvuldige bepaling van deze curve noodig, zijn dus vele titraties tijdens het zuringsproces uit te voeren, terwijl daarna een moeizame berekening uitgevoerd moet worden. Wij hebben daarvan dus afgezien en een eenvoudiger weg gevolgd, gebruik makende van de omstandigheid, dat een logarithmische lijn in een bepaald traject slechts weinig van een rechte lijn afwijkt. Het is dus voldoende om in dit gedeelte van het zuringstraject 2 punten te bepalen. Men kan dan volstaan met 2 titraties op 2 verschillende tijdstippen. De bovengrens van bedoeld traject ligt bij een titer van 60 à 65 ml n/10 zuur per 100 g zurende melk. Bij verdere zuring komt men nl. in het gedeelte der zuurvormingsvertraging, waar dus de groei en de zuurvorming niet meer logarithmisch geschieden. Ook uit andere hoofde is het ongewenscht om hoogere zuurgraden te titreeren, daar bij verdere zuring de zuurstremming der melk hinderlijk is bij de bepaling en de aromabacteriën in het zuursel koolzuur gaan produceeren, hetgeen gedeeltelijk meegetitreerd wordt en dus de bepaling van het melkzuur door eenvoudige titratie onmogelijk maakt. De onderste grens ligt bij ongeveer 40 ml n/10 zuur per 100 g melkcultuur, omdat bij lageren zuurgraad de logarithmische lijn steeds meer van een rechte lijn gaat afwijken.

In fig. 2 geven wij eenige voorbeelden om te laten zien, dat in het traject van 40—60 de steilste helling verkregen wordt, terwijl in fig. 3 enkele proeven werden geteekend, waarbij in kortere intervallen getitreerd werd om te laten zien, dat inderdaad in het genoemde traject de titreerlijn weinig van de rechte afwijkt.

Bij de onderzochte zuursels werden de bepalingen nu als volgt uitgevoerd: 's middags te 17 uur werd een kolf met 300 ml gesteriliseerde centrifugemelk, welke door een verblijf van eenige uren in een waterbad van 21,0° C op temperatuur gebracht was geënt met 0,02 ml zuursel door 1 ml zuursel te verdeelen in een kolf, waarin 100 ml gesteriliseerd water was en hiervan met een steriele

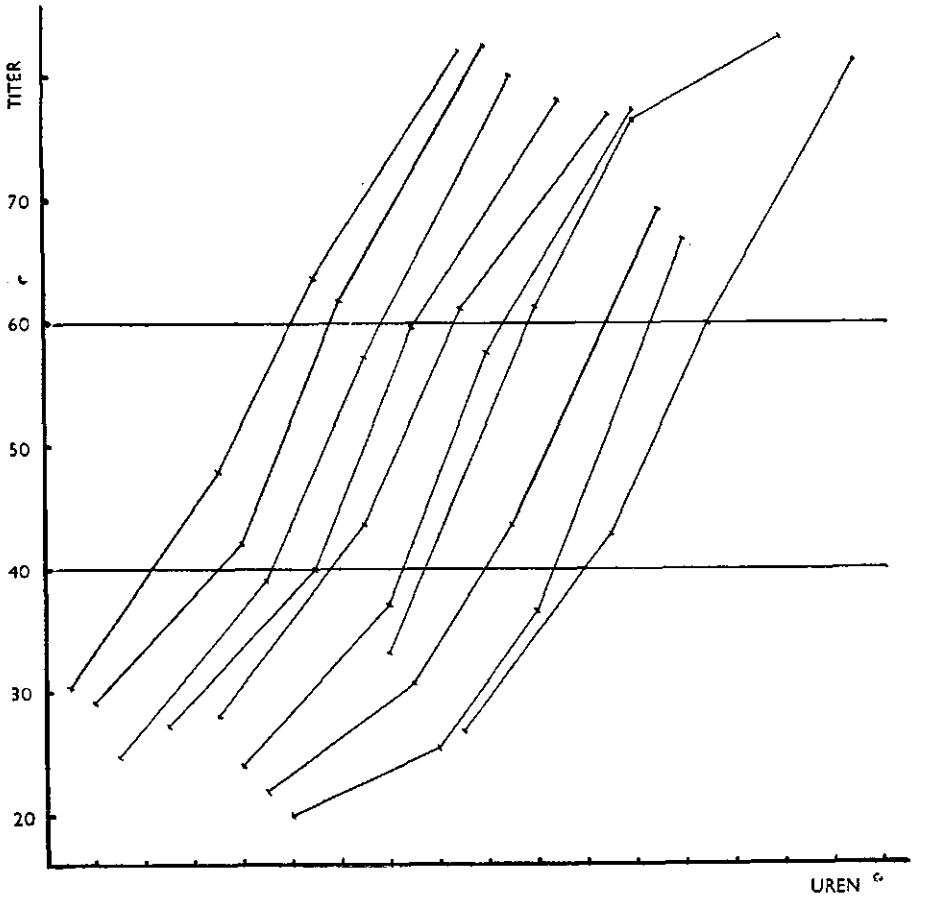


Fig. 2

Titratie van verschillende zuursels met intervallen van 2 en 3 uur

pipet 2 ml over te brengen. De geënte kolf werd in een waterbad van 21,0° C geplaatst en den volgenden dag werden op enkele tijdstippen titraties uitgevoerd door met een pipet vloeistof uit de kolf te nemen, hiervan **25 g af te wegen** en deze te titreeren met n/10 loog en phenolphtaleïne als indicator. De tijdstippen van titreeren werden zóó gekozen, dat twee der titreercijfers zoo dicht mogelijk bij 10 en 15 ml n/10 per 25 g vielen. Dan werd uitgerekend in hoeveel tijd de zurende cultuur het traject van 40 tot 60 ml n/10 per 100 g had doorloopen door de titreerpunten op millimeterpapier uit te zetten. De lijn, die door deze 2 titreerpunten (*a* en *b*) getrokken kon worden, werd doorgetrokken tot de horizontale lijnen 40 en 60 (snijpunten *c* en *d*) en de

uurafstand tusschen de snijpunten gemeten (afstand c—d'). In fig. 4 zijn hiervan enkele voorbeelden gegeven.

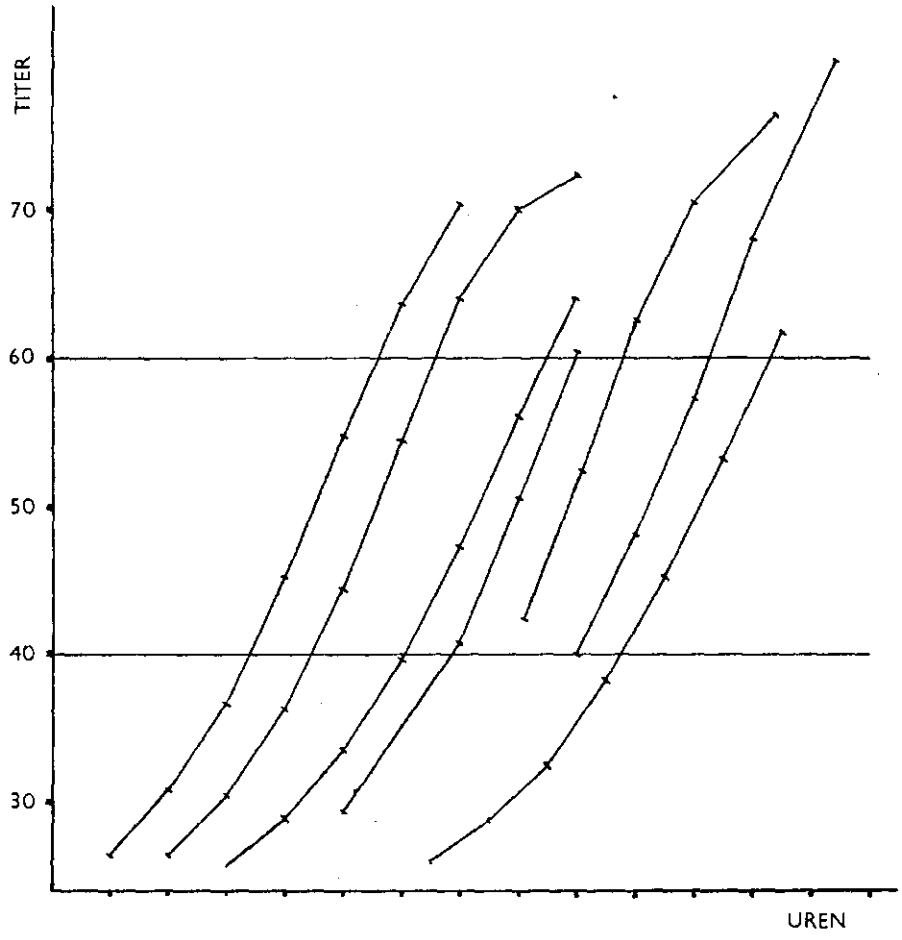


Fig. 3

Titratie van verschillende zuursels met intervallen van 1 uur

Deze methode is toegepast op 39 practijkzuursels en wij vonden:
1,7 uur bij zuursel 51,
1,8 uur bij de zuursels 23, 39 en 46,
1,9 uur bij de zuursels 17, 18, 19, 20, 24, 27, 35 en 41,
2,0 uur bij de zuursels 7, 11, 13, 14, 15, 16, 25, 28, 29, 38, 42 en 44,
2,1 uur bij de zuursels 26, 32 en 33,
2,2 uur bij de zuursels 12, 37 en 43,

2,3 uur bij de zuursels 10, 21, 22, 45 en 47,
2,4 uur bij de zuursels 30, 31 en 36,
2,6 uur bij het zuursel 34.

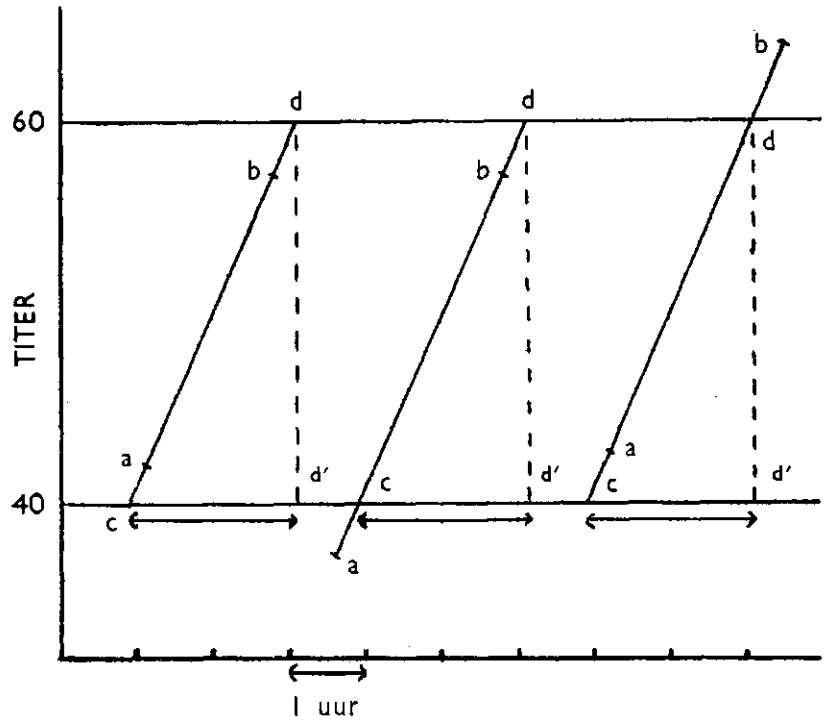


Fig. 4

Enkele voorbeelden voor het bepalen van de zuringssnelheid van een zuursel uit 2 titraties

De tijden loopen dus uiteen van 1,7 tot 2,6 uren. Om hieruit conclusies te trekken dienen we te weten of de gevolgde methode reproduceerbare uitkomsten geeft. Daartoe werden een aantal malen met hetzelfde zuursel (M 1) duplobepalingen gedaan onder dezelfde omstandigheden en in dezelfde melk. Bij 18 bepalingen werd 8 keer hetzelfde getal gevonden, 5 keer een verschil van 0,1 uur, 3 keer een verschil van 0,2 uur en 2 keer een verschil van 0,3 uur. Bij deze laatste was evenwel de oorzaak van het verschil daarin gelegen, dat de titreerpunten niet voldoende dicht bij de titers 40 en 60 lagen. De nauwkeurigheid is dus bevredigend.

Ook krijgt men een indruk van de nauwkeurigheid als men de bepalingen bij de practijkzuursels herhaalt. Hierbij worden duplobepalingen vergeleken, welke niet op denzelfden dag en niet in dezelfde melk verricht werden. Bij

een aantal der practijkzuursels werd de tweede bepaling den volgenden dag gedaan en wij vonden:

1,8 uur bij de zuursels 16, 21, 24,
1,9 uur bij de zuursels 20, 25, 28, 29,
2,0 uur bij de zuursels 23, 35, 38, 41, 46,
2,1 uur bij de zuursels 13, 27, 33, 47,
2,2 uur bij de zuursels 14, 19, 37, 42, 44,
2,3 uur bij de zuursels 11, 15, 22, 26, 32, 34, 43, 45,
2,5 uur bij zuursel 36,
2,6 uur bij zuursel 30,
3,0 uur bij zuursel 31.

De afwijking met de eerste bepaling bedroeg dus niet meer dan hoogstens 0,3 uur, behalve bij de zuursels 21 en 31, waar zij resp. 0,5 en 0,6 uur was.

Bij enkele zuursels zijn meer bepalingen verricht en wij vonden bij

zuursel 11: resp. 2,0; 2,3; 2,1; 2,1; 2,1 en 2,2 uur,
zuursel 13: resp. 2,0; 2,1 en 2,0 uur,
zuursel 16: resp. 2,0; 1,8 en 2,0 uur,
zuursel 20: resp. 1,9; 1,9 en 2,1 uur.

Ook hier zien wij niet grootere afwijkingen dan 0,3 uur. Uit alle tot nu toe vermelde cijfers zou dus volgen, dat de zuringssnelheid met een nauwkeurigheid van 0,2 à 0,3 uur bepaald kan worden.

Bij deze bepalingen werd melk gebruikt òf van denzelfden dag òf van achtereenvolgende dagen. Over een tijdsverloop van 1½ jaar werd bij het herhaalde onderzoek van steeds hetzelfde zuursel (M 1) meer variatie gevonden, nl.:

2	keer	1,7 uur	10	keer	2,2 uur
2	„	1,8 „	2	„	2,3 „
17	„	1,9 „	1	„	2,4 „
16	„	2,0 „	1	„	2,5 „
20	„	2,1 „	2	„	2,6 „

De meeste gevallen liggen tusschen 1,9 en 2,2 uur; dit is dus weer een verschil van 0,3 uur.

Dikwijls wordt vermoed, dat men een groote vertraging der zuringssnelheid krijgt in melk, welke door lang staan met lucht verzadigd is geworden. Wij hebben daarom vergeleken zuringen in melk, welke door flink schudden met lucht verzadigd werd en in melk, welke na de sterilisatie in een waterstofatmosfeer afgekoeld en bewaard was. De verschillen, die wij daarbij

vonden, waren echter dezelfde als die bij gewone duplobepalingen, zoodat van een invloed van dezen factor niets merkbaar was.

We moeten dus wel aannemen, dat bij de enkele afwijkingen, hierboven genoemd, de eigenschappen der gebruikte melk een rol spelen.

De rustperiode, waarvan in den aanvang sprake was, is bij een zuursel moeilijk te bepalen. Indien nl. bij vergelijking van 2 zuursels, die met eenzelfde hoeveelheid in melk geënt worden, het eene zuursel een bepaalde titer (b.v. 40 ml n/10 per 100 ml) eerder bereikt dan het andere zuursel, kan dit veroorzaakt worden doordat dit eene zuursel een kortere rustperiode had, doch ook doordat het een iets grootere zuringssnelheid had. In het algemeen vonden wij bij de onderzochte practijkzuursels een eerder bereiken van het titerpunt 40 als de zuringssnelheid ook inderdaad iets grooter was. Ook hieruit moge blijken, dat de rustperiode niet van veel belang kan zijn bij de beoordeeling van een zuursel.

Hoewel dus aan de gebezigde titratiemethode ter bepaling van de zuringssnelheid nog wel enkele onvolkomenheden kleven, kan zij toch goede diensten bewijzen, terwijl, voor het geval men onzeker over de uitkomst is, de bepaling gemakkelijk herhaald kan worden.

We willen er evenwel nogmaals de aandacht op vestigen, dat de bepalingen dienen te geschieden bij een nauwkeurig constante temperatuur en dat onze gegevens betrekking hebben op een temperatuur van 21,0° C. Verder moeten de 2 titratiepunten, waaruit het tijdsverloop der zuring tusschen de titers 40 en 60 ml n/10 per 100 g berekend wordt, zoo dicht mogelijk bij deze 2 cijfers liggen.

Na het bovenstaande moeten wij dus tot de conclusie komen, **dat bijna alle onderzochte zuursels een behoorlijke zuringssnelheid bezaten.** Een zuringssnelheid, waarbij het titertraject 40—60 ml n/10 per 100 ml doorloopen, wordt in 2,0 uur, is als normaal te beschouwen. Is deze tijd hooger dan 2,3 uur, dan is het zuursel duidelijk iets traag. Dit is het geval geweest bij 4 der onderzochte zuursels.

B. DE AROMAVORMING

1. Algemeene inzichten

Bij ons onderzoek over de werkzaamheid der aromabacteriën (1) kwamen wij tot de conclusie, dat de aromabacteriën (Betacoccus cremoris) het citroenzuur der melk aantasten en hieruit bij geringen zuurgraad der melk koolzuur, azijnzuur en alkohol doen ontstaan, doch bij hooger wordende zuurgraden

daarnaast toenemende hoeveelheden C_4-producten (diacetyl, acetylmethylcarbinol en butyleenglycol) vormen. Van deze C_4-producten, wier ontstaan ten koste van dat van azijnzuur en alkohol gaat, is het acetylmethylcarbinol het normale product, dat altijd ontstaat. Bij toetreding van luchtzuurstof vormt zich ook diacetyl, de eigenlijke typische geurstof van zuursel en boter, bereid uit gezuurden room. Verder ziet men dikwijls in cultures van aromabacteriën en in mengcultures van deze met melkzuurbacteriën een reductie optreden, waarbij acetylmethylcarbinol en diacetyl gereduceerd worden tot butyleenglycol. Bij dit proces verliest de cultuur dus den typischen zuurselgeur en blijft slechts een azijnzuurachtige geur over.

Wat er nu in een zuursel geschiedt hangt eensdeels af van de eigenschappen der aromabacteriën en anderdeels van den invloed, welken de zuring door de melkzuurbacteriën op de werkzaamheid der aromabacteriën uitoefent. Er zijn daarbij verschillende mogelijkheden.

Bij een goed verloop der aromavorming zal de werkzaamheid der aromabacteriën zoodanig moeten zijn, dat veel C_4-stoffen ontstaan en dat diacetyl en acetylmethylcarbinol ook in de cultuur bewaard blijven en dus niet tot butyleenglycol gereduceerd worden.

Treedt er sterke reductie op, dan zal een dergelijk zuursel, ook al worden veel C_4-stoffen gevormd, niet als goed beschouwd kunnen worden, omdat het meer of minder spoedig zijn geur verliest.

In de genoemde twee gevallen werd een goede samenwerking tusschen melkzuur- en aromabacteriën aangenomen. Daarbij vindt de ontleding van het citroenzuur in een zoodanige phase van het zuringsproces plaats, dat het meeste citroenzuur omgezet wordt bij zuurgraden, die geschikt zijn voor de vorming van de C_4-producten. Vindt echter de citroenzuurontleding naar verhouding te snel plaats, dan zal reeds veel omgezet zijn vóór een hoogen zuurgraad bereikt is en zullen dus minder C_4-producten, doch des te meer azijnzuur en alkohol ontstaan. Dan is er dus slechts een beperkte vorming van geurstof. In dit geval kan ook reductie optreden.

Vindt daarentegen de citroenzuurontleding te langzaam plaats, dan is het zuursel ook langzaam in zijn aromavorming. De C_4-stoffen kunnen dan voor het grootste deel pas in de laatste phase der zuring, dus bij hoogen zuurgraad, ontstaan, zij het wel in groote hoeveelheid, doch pas na langen tijd. Reductie is hier minder te verwachten, daar de reductie bij hoogere zuurgraden zwakker is.

Tenslotte is nog denkbaar een zuursel, waarin aromabacteriën ontbreken. Hierin zal geen vorming van C_4-stoffen kunnen geschieden.

Wat wij dus op grond van reeds verworven kennis in zuursels kunnen verwachten, kunnen wij samenvatten in de volgende mogelijkheden:

a. Citroenzuurontleding normaal. Veel C_4-stoffen. Geringe reductie.

b. Citroenzuurontleding normaal. Veel C_4-stoffen. Sterke reductie.

c. Te vroege citroenzuurontleding. Weinig C_4-stoffen. Sterke reductie.

d. Te late citroenzuurontleding. Veel C_4-stoffen. Geringe reductie.

e. Geen citroenzuurontleding, omdat aromabacteriën ontbreken. Geen C_4-stoffen.

Alleen in het geval *a* is het verloop der aromavorming goed te noemen.

De bedoeling van het onderzoek was na te gaan of deze gevallen ook werkelijk bij practijkzuursels voorkomen en of er inderdaad verband bestaat tusschen de citroenzuuromzetting en de aromavormende eigenschappen van een zuursel.

2. Onderzoek der eerste groep van 25 zuursels

Bij de eerste 25 onderzochte zuursels hebben wij getracht eenige oriënteering over de aromavorming te verkrijgen en enkele methoden te probeeren. Bij de meeste zuursels werd op de volgende wijze te werk gegaan.

Van het uit de practijk ontvangen zuursel werden bepaald bij aankomst: titer per 25 g, kreatinereactie en aanwezigheid van citroenzuur. Tevens werd een oppervlaktecultuur aangelegd op Weigelatine, om na afenting in centrifugemelk van hierop gegroeide bacteriënkoloniën te kunnen bepalen welk deel van de flora uit aromabacteriën bestond. Na 24 uur werd nogmaals de kreatinereactie in het bij 18—20° C bewaarde zuursel gedaan.

Verder werd het zuursel in hoeveelheden van 0,05 % en 2 % geënt in 300 ml centrifugemelk en in de verkregen culturen na 24, 40 en 48 uur de kreatinereactie uitgevoerd. Ditzelfde werd gedaan met een cultuur (geënt met 0,05 %) van een eigen zuursel M 1 om een vergelijking te bezitten. In de zuurselculturen werd na 40 uur het azijnzuurgehalte bepaald en nagegaan of het citroenzuur op dien tijd reeds geheel was omgezet.

Om een inzicht te krijgen in de vorming van C_4-stoffen werd gebruik gemaakt van de door HAMMER (4) geïntroduceerde „Kreatinereactie". De aanwezigheid van diacetyl en acetylmethylcarbinol verraadt zich in deze reactie door het ontstaan van een roode kleur, die sterker is naarmate de cultuur méér van deze stoffen bevat. Butyleenglycol wordt er niet mede aangetoond, zoodat men met de kreatinereactie geen oordeel krijgt over de totale hoeveelheid aanwezige C_4-stoffen.

Wij voerden de reactie uit door in een reageerbuis bij 2,5 ml cultuur 1 ml 1 %-kreatineoplossing en 2,5 ml 40 % NaOH te voegen, eenige keeren flink lucht door te schudden en de ontstane kleur na een kwartier te beoordeelen.

Deze werd vergeleken met een standaard van 0,01 % congoroodoplossing in water, zoodanig dat een kreatinereactie

van + overeenkwam met 0,25 ml congoroodoplossing + 2,5 ml melk + 2,5 ml NaOH,

„ ++ „ „ 0,50 ml idem,

„ +++ „ „ 0,75 ml idem,

„ ++++ „ „ 1,00 ml idem, enz.

Deze hoeveelheden komen ongeveer overeen met resp. 60, 120, 180, 240 enz. mg acetylmethylcarbinol per l. Nauwkeurige uitkomsten geeft de reactie blijkens onze ervaring niet. Men kan haar echter heel goed gebruiken voor oriënteeringsdoeleinden.

Het citroenzuur werd bepaald volgens een vroeger (3) beschreven methode; het azijnzuur werd met de destillatiemethode bepaald.

De bacteriënflora op de Weigelatine werd onderzocht door afenten van 25 of 50 koloniën in centrifugemelk. De in een tijdsverloop van 7 dagen bij 21° C door zuur gestremde culturen werden beschouwd als melkzuurbacteriën; van de niet-gestremde werd onderzocht of het aromabacteriën waren. Daartoe werden zij geënt in kolfjes met 30 ml centrifugemelk, waaraan 1,8 en 2,1 ml gesteriliseerde n/1 citroenzuuroplossing was toegevoegd. Deze voedingsbodem is volgens onze ervaring het gunstigst voor het ontstaan van aroma. Gekweekt werd bij 21° C en op achtereenvolgende dagen werden de kolfjes geroken om het al of niet optreden van den typischen geur te beoordeelen.

Op deze wijze onderzocht, kregen wij een inzicht in de volgende factoren.

De rijpheid van het zuursel op het oogenblik van ontvangst. Deze kan, wat den zuringstoestand betreft, worden afgelezen uit den titer en wat de aromavorming betreft uit de aan- of afwezigheid van citroenzuur.

De neiging van het zuursel om zijn gevormd diacetyl en acetylmethylcarbinol te bewaren. Deze blijkt uit het blijven bestaan of verdwijnen van de kreatinereactie in het zuursel zelf en in de met 0,05 en 2 % geënte culturen.

De werkzaamheid der aromabacterien. Deze kan afgeleid worden uit het verloop der kreatinereacties, het ontleden van citroenzuur en de vorming van azijnzuur.

In tabel 2 vindt men een overzicht van de voornaamste typen, welke wij bij de eerste 25 zuursels tegenkwamen. Alle zuursels zijn niet vermeld, daar in latere hoofdstukken meer gegevens volgen.

Volgens de citroenzuurbepaling in het oorspronkelijke zuursel zijn de zuursels 11, 12, 20 en 22 in niet geheel uitgerijpten toestand aangekomen. Bij de zuursels 11 en 12 was echter de zuring wel op haar maximum, zoodat wij moeten aannemen, dat hier de aromabacteriën langzaam werkten. Dit

TABEL 2

Zuursel	Oorspronkelijk zuursel: Titer per 100 g	Kreatinereactie: aank.	Kreatinereactie: na 24 uur	mg/l citroenzuur	% aromabacteriën	Kreatinereacties: Zuursel 0,05 % enting: 24 u.	40 u.	48 u.	Zuursel 2 % enting: 24 u.	40 u.	48 u.	M 1 0,05 % enting: 24 u.	40 u.	48 u.	Citroenzuur na 40 u.: 0,05 %	2 %	mg/l azijnzuur na 40 u.: 0,05 %	2 %
2		+			4	—	+++(+)	+(+)	++	++++	++				—	—	969	1035
5		—			4	—	++(+)	+(+)	+	+	+	+	+++	++(+)	—	+	859	1321
8	104,4	—		—	12	(+)	+++	++++	+++		+++	+	+++	+++	—	—	837	1028
11	108,0	—	—	346	0	—	—	±	+++	+++	++	±	++++(+)	++++	+	+	198	275
12	108,8	—	—	304	0	—	—		—	—		(+)	++++		+	+	213	646
14	98,0	++	+(+)	—	24	±	(+)	+(+)	+(+)	+(+)	(+)	(+)	++++	++++	—	—	925	1006
15	110,0	—	—	—	8	±	+++	++	++	(+)	—	—	+++(+)	+++	—	—	822	998
18	103,2	—	—	—	4	—	+		—	—		+	+++(+)		+	—	328	1321
19	105,6	±	—	—	4	—	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++	±	++++	++++	—	—	947	1057
20	92,0	±	—	186	32	(+)	++(+)	++(+)	++	+	(+)	(+)	++++	++++	—	—	1006	1226
22	91,6	+	+++	1224	4	(—)	+(+)	(+)	+++	++	++	±	+++	+++(+)	—	—	969	1050
23	105,2	—	—	—	14	(—)	+	(—)	(—)	—	—	(—)	++++	++++	—	—	962	1314
25	107,2	(—)	—	—	8	—	++(+)	+++	(+)	+	(+)	—	+++	+++(+)	+	—	683	1233

komt overeen met de lage azijnzuurcijfers in de van de zuursels gemaakte culturen bij beide entpercentages na 40 uur. Daar het citroenzuur door de aromabacteriën voor een deel in azijnzuur wordt omgezet, bewijzen deze lage cijfers, dat de citroenzuurontleding zeer langzaam verliep en dat, verhoudingsgewijs gesproken, de aromabacteriën in hun werkzaamheid bij de melkzuurbacteriën achterbleven. Inderdaad is na 40 uren dan ook nog citroenzuur in de culturen aanwezig. De oorzaak lag hier dus in een te gering aantal aromabacteriën, hetgeen ook bleek uit de waarneming, dat de aromabacteriën 0 % der bacteriënflora uitmaakten. Hun groeikracht was blijkbaar te gering. Zuursel 11 gaf dan ook pas 90 uur na de overenting met 0,05 % een kreatinereactie van + + + +.

Bij de zuursels 20 en 22 volgt uit de lage titer, dat zij in niet uitgezuurden toestand werden ontvangen. Hoewel zuursel 22 toen nog 1224 mg citroenzuur per l bevatte, is dit blijkbaar niet abnormaal, daar de overentingen na 40 uur een normaal azijnzuurgehalte hadden en alle citroenzuur volledig was omgezet. Daar No. 22 nog zooveel citroenzuur bevatte, zien we hier in het oorspronkelijke zuursel nog een flinke toename van de kreatinereactie, hetgeen bij de andere zuursels nooit voorkwam.

De uitkomsten der kreatinereactie zijn bij bijna alle ontvangen zuursels zeer bedroevend. Bij de 25 zuursels waren er slechts 4, die bij aankomst een kreatinereactie van + + of meer hadden. Daar bij de overentingen de meeste zuursels wel een tamelijk duidelijke kreatinereactie vertoonden, moet dus geconcludeerd worden, dat bijna alle zuursels een snelle reductie van acetylmethylcarbinol en diacetyl tot butyleenglycol vertoonden. Dit moet als een nadeel beschouwd worden, daar dergelijke zuursels hun aroma spoedig verliezen. De aangename zuurselgeur gaat bij het reductieverschijnsel verloren en maakt plaats voor een azijnzuurachtigen geur.

De reductie is ook bij de overentingen waar te nemen, hoewel nog niet zoo duidelijk, daar vooral tusschen de 2de en de 3de bepaling een korte tijd ligt.

Het ligt voor de hand, dat zij beter zichtbaar zal zijn bij de 2 % enting dan bij de 0,05 % enting, daar de eerste op denzelfden tijd in een latere ontwikkelingsphase is.

Het vergelijkingszuursel M 1 heeft steeds een sterke kreatinereactie en weinig neiging tot reductie, hetgeen wij ook later nog zullen zien.

Een verband tusschen het percentage aromabacteriën in het zuursel en den uitslag der aromavorming is niet aanwezig, behalve in de uiterste gevallen bij de zuursels 11, 12 en 20. Bij de eerste twee is bij 0 % aromabacteriën inderdaad de ontleding van het citroenzuur te langzaam, bij het laatste is de activiteit der aromabacteriën zóó groot, dat in het oorspronkelijk zuursel

de kreatinereactie negatief werd na 24 uur, hoewel bij aankomst nog citroenzuur in het zuursel aantoonbaar was.

Uit de cijfers voor het azijnzuur blijkt ook, dat na 40 uur de rijping van de met 2 % geënte cultuur verder voortgeschreden is dan die van de met 0,05 % geënte. Steeds is bij de 2 % enting het azijnzuurgehalte het hoogst.

Wij willen thans nog even stilstaan bij het feit, dat in een aantal zuursels, nl. 5, 18, 20, 23 en 25, bij de 2 % enting een abnormaal hoog azijnzuurgehalte gevonden werd.

Het azijnzuur in een uitgerijpt zuursel is afkomstig van minstens 3 bronnen, te weten dat, wat ontstaat bij de ontleding van het citroenzuur door de aromabacteriën, dat, wat de aromabacteriën uit suiker produceeren, en het weinige azijnzuur, dat de melkzuurbacteriën uit suiker vormen. Van de laatste twee hoeveelheden weten wij, dat zij niet groot zijn; in culturen van melkzuurstreptococcen vonden wij van 132 tot in het hoogste geval 213 mg per l cultuur. Uit 1 molecule citroenzuur doen de aromabacteriën, volgens onze beschouwingswijze, ontstaan van 1 tot 1,5 molecule azijnzuur, d.i. ongeveer van 572 tot 858 mg per l bij een citroenzuurgehalte der melk van 0,2 %. Uit vele verschillende bepalingen konden wij afleiden, dat in culturen zonder aromavorming, waarin dus het meeste azijnzuur ontstaat, het gehalte aan deze stof tot een maximum van ongeveer 1150 mg per l kan stijgen.

Bij de genoemde zuursels werd evenwel een cijfer bij 1300 mg gevonden. Daar wij dit verschijnsel een enkele keer meer bij zuursels zagen, hebben wij hiernaar een nader onderzoek ingesteld, echter zonder tot een verklaring te komen. Het verschijnsel heeft zich bij ons onderzoek alleen voorgedaan bij zuursels, waarbij de melk met een hoog percentage zuursel geënt was. Zoodra een zuursel, dat het vertoonde, met een zeer kleine hoeveelheid overgeënt werd, werd het azijnzuurgehalte normaal en bleef normaal, ook bij groote entingen. Dit deed ons denken, dat dergelijke zuursels een azijnzuurproduceerende bacteriesoort in betrekkelijk gering aantal zou bevatten, doch het is ons nooit gelukt een dergelijke bacterie op te sporen. Ook konden wij onder de normale bacteriën, b.v. de melkzuurstreptococcen en de nietzuurvormende streptococcen, geen stammen vinden, die veel azijnzuur produceerden.

Het verschijnsel der te hooge azijnzuurproductie heeft weinig verband met de aromabacteriën. Het zuursel 5 b.v., bevatte in de 2 % enting na 40 uur zelf nog citroenzuur, terwijl de normaal aromavormende 0,05 % enting toen reeds citroenzuurvrij was. Toch meenen wij het als een nadeel te moeten beschouwen, daar de meeste van deze zuursels een sterke reductie vertoonen en soms zelfs niet tot een positieve kreatinereactie komen. De geur is dan sterk azijnig.

Voor zoover uit de nog schaarsche gegevens afgeleid kan worden, komt van de in hoofdstuk B 1 opgesomde mogelijkheden bij deze 25 zuursels het geval *a* (goede aromavorming) eigenlijk niet voor. We zouden er de zuursels 8, 19 en 22 toe kunnen rekenen, hoewel uit de kreatinereacties van de oorspronkelijke zuursels blijkt, dat 8 en 19 eerder tot het geval *b* (sterke reductie) behooren. Dit geval *b* komt overheerschend voor. Het geval *d* (te late werking) vonden wij bij de zuursels 11, 12, 18 en 25. Ontbreken van aromabacteriën (geval *e*) kwam niet voor, want ook daar, waar in de flora 0 % aromabacteriën gevonden werden, waren zij blijkens de azijnzuurvorming toch aanwezig.

3. De reductie van diacetyl en acetylmethylcarbinol

Daar het verschijnsel der reductie zoo veel in zuursels voorkomt, willen wij hierop nader ingaan. In ons vorige artikel (1) zijn hieraan reeds beschouwingen gewijd, waaruit wij concludeerden, dat het verschijnsel der reductie door de aromabacteriën wordt veroorzaakt. Melkzuurstreptococcen zijn, hoewel zij een sterk reductievermogen bezitten, blijkbaar niet in staat de genoemde stoffen tot butyleenglycol te reduceeren.

Wij zagen, dat de reductie der aromabacteriën bij lagere zuurgraden grooter is dan bij hoogere zuurgraden.

Het acetylmethylcarbinol, dat tot butyleenglycol gereduceerd wordt, neemt daarbij waterstof op. Deze moet door een andere, in de culturen aanwezige stof geleverd worden en deze stof kan een tusschenproduct der citroenzuurontleding zijn, b.v. het acetaldehyde (dat daarbij tot azijnzuur geoxydeerd zou worden) of zij kan een tusschenproduct in de suikerontleding der aromabacteriën zijn. De kwantitatieve gegevens over de ontledingsproducten waren echter nooit in overeenstemming met de eerstgenoemde veronderstelling te brengen, zoodat wij moeten aannemen, dat de reductie onafhankelijk van de citroenzuurontleding geschiedt. Dit wordt bevestigd door het feit, dat de reductie ook plaats heeft als de citroenzuurontleding reeds geheel tot een einde gekomen is. In het hoofdstuk B 4, waarin de analyses der practijkzuursels besproken worden, zal men vele duidelijke voorbeelden hiervan vinden. Een speciaal daartoe bedoelde proef geeft dit evenzoo te zien.

Op 30 Mei 1938 werden 2 kolven met 1 l gesteriliseerde centrifugemelk, waaraan 60 ml n/1 melkzuur was toegevoegd, geënt met 0,1 % melkcultuur van de aromabetacoccus *d*. Aan één der kolven werd bovendien nog 450 mg acetylmethylcarbinol toegevoegd. De analyses vindt men in tabel 3 en grafisch voorgesteld in figuur 5.

We zien hieruit tevens, dat het reductievermogen van de gebruikte aromabetacoccusstam zóó groot is, dat nog veel meer acetylmethylcarbinol gereduceerd kan worden dan in melk uit de normale hoeveelheid citroenzuur gevormd

TABEL 3

Kolf I bevat geen extra-toegevoegd acetylmethylcarbinol; aan kolf II is 450 mg/l toegevoegd

Analyse op	Kolf	mg per l			Citroenzuur
		acetylmethyl-carbinol	butyleen-glycol	azijnzuur	
4 Juni	I	247	36	754	Geheel omgezet.
	II	628	50	825	" "
7 do	I	0	255	854	
	II	150	492	977	
9 do	I	0	250	852	
	II	0	620	1043	

wordt. Bijna alle carbinol is in deze proef gereduceerd nadat het citroenzuur verdwenen was. Tusschen den 5den en den 10den dag is de totale hoeveelheid C_4-producten vrijwel constant gebleven; er is slechts een geringe daling.

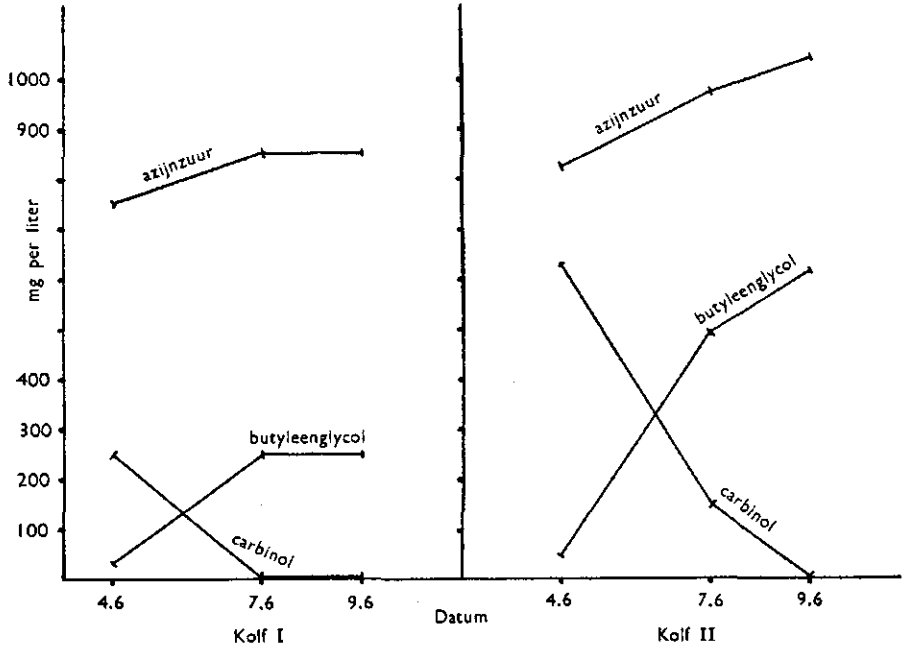


Fig. 5

Reductie van acetylmethylcarbinol tot butyleenglycol door een reincultuur van aromabetacoccus *d* in met melkzuur zuurgemaakte melk. Aan kolf II was bovendien extra acetylmethylcarbinol toegevoegd.

In citroenzuurvrije vloeistoffen vindt de reductie van het acetylmethylcarbinol ook plaats, hetgeen eveneens bewijst, dat deze reductie buiten het eigenlijke citroenzuurstofwisselingsproces staat.

Een aantal kolven met 200 ml glucose-vleeschbouillon werd op 15 September 1938 geënt met de aromabetacoccen *d*; 35,18; 18,5 en *a* 1. Aan de kolven I was toegevoegd 23,5 ml water, aan de kolven II 20 ml van een acetylmethylcarbinoloplossing (60,1 mg) en 3,5 ml water. De analyses zijn vermeld in tabel 4.

TABEL 4

Aromabetacoccen in glucose-vleeschbouillon met of zonder acetylmethylcarbinol

Aroma-betacoccus	Voedingsbodem	Analyse na	mg per l		
			acetyl-methyl-carbinol	butyleen-glycol	azijnzuur
d	bouillon	5 dagen	0	76,5	305
	id. + a.m.c.	5 „	0	319	377
35,18	bouillon	6 dagen	0	49,5	283
	id. + a.m.c.	6 „	0	288	338
18,5	bouillon	6 dagen	0	63	312
	id. + a.m.c.	6 „	0	297	382
a 1	bouillon	10 dagen	0	22,5	430
	id. + a.m.c.	10 „	98	190	389

Ook hier is duidelijk reductie opgetreden; het minste bij den stam *a* 1, doch van deze was ons het geringe reductievermogen bekend.

Door toevoeging van methyleenblauw kon in deze proef de reductie niet verhinderd worden.

Daar dus de reductie in citroenzuurvrije vloeistoffen kan optreden en in citroenzuurhoudende vloeistoffen nog langen tijd na het verdwijnen van het citroenzuur merkbaar is, kan dus moeilijk anders dan besloten worden tot een **reageeren van het acetylmethylcarbinol onder invloed der bacterie-werkzaamheid met de tusschenproducten der suikerontleding en niet met die der citroenzuuromzetting.** Blijkens de cijfers voor het ontstane azijnzuur, welke ook in de tabellen 3 en 4 opgegeven zijn, wordt een deel van deze tusschenproducten daarbij tot azijnzuur geoxydeerd (behalve in het geval *a* 1 van tabel 4).

Nadat het citroenzuur van de melk is ontleed, kunnen de aromabetacoccen dus nog werkzaam blijven, hetgeen ook volgt uit de omstandigheid, dat zij in staat zijn veel meer citroenzuur dan de normaal in melk voorkomende

hoeveelheid te vergisten, ook als dit meerdere citroenzuur wordt toegevoegd als de normale hoeveelheid omgezet of bijna omgezet is.

Toen bewezen was, dat de reductie in ieder geval nog kan plaats hebben na het volledig verdwijnen van het citroenzuur, deed zich de vraag voor of de aanwezigheid van citroenzuur de reductie verhindert. Het zou nl. mogelijk zijn, dat de aromabacteriën, die typische citroenzuurvergisters zijn, hun werkzaamheid pas op de reductie zullen omschakelen als zij geen citroenzuur (meer) tot hun beschikking hebben. Dat wij bij sterk reduceerende zuursels door toevoeging van extra citroenzuur konden verhinderen, dat de kreatinereactie negatief werd, is hiervoor geen bewijs, daar acetylmethylcarbinol door de aromabacteriën gevormd wordt zoolang zij in staat zijn citroenzuur te ontleden. Daarom hebben wij enkele proeven over deze vraag genomen.

Bij de eerste proef van 2 Mei 1938 werden 2 kolven, I en II, met 1 l centrifugemelk + 50 ml n/1 melkzuur geënt met 0,1 % melkcultuur van de aromabetacoccus *d* en toen op 4 Mei (na 45 uur) nog slechts een zeer geringe hoeveelheid citroenzuur meer over was, werd aan één dezer kolven (I) een oplossing van 7 g natriumcitraat toegevoegd.

De analysecijfers vindt men in tabel 5 en de getallen van kolf I zijn *grafisch voorgesteld in figuur 6.*

TABEL 5

Analyse na	Kolf	Citroenzuur	mg per l			R
			acetyl-methyl-carbinol	butyleen-glycol	azijnzuur	
45 uur	I	±	122	23	523	
	II	±	79	35	514	
Na 45 uur aan kolf I citraat toegevoegd						
64 uur	I	+ + +	397	159	1630	25
	II	—	18	160	766	
88 uur	I	+ +	296	332	2160	52
	II	—	0	174	818	
8 dagen	I	—	0	664	2892	100

Uit deze cijfers ziet men duidelijk, dat in de kolf, waaraan citraat is toegevoegd, de reductie ook reeds optreedt als nog citroenzuur aanwezig is en als we de cijfers van kolf I met die van kolf II vergelijken, blijkt, dat in de 19 uren, welke tusschen de eerste en de tweede analyse verliepen, in de kolf, waarin alleen nog gedurende enkele uren in het begin zeer weinig citroenzuur

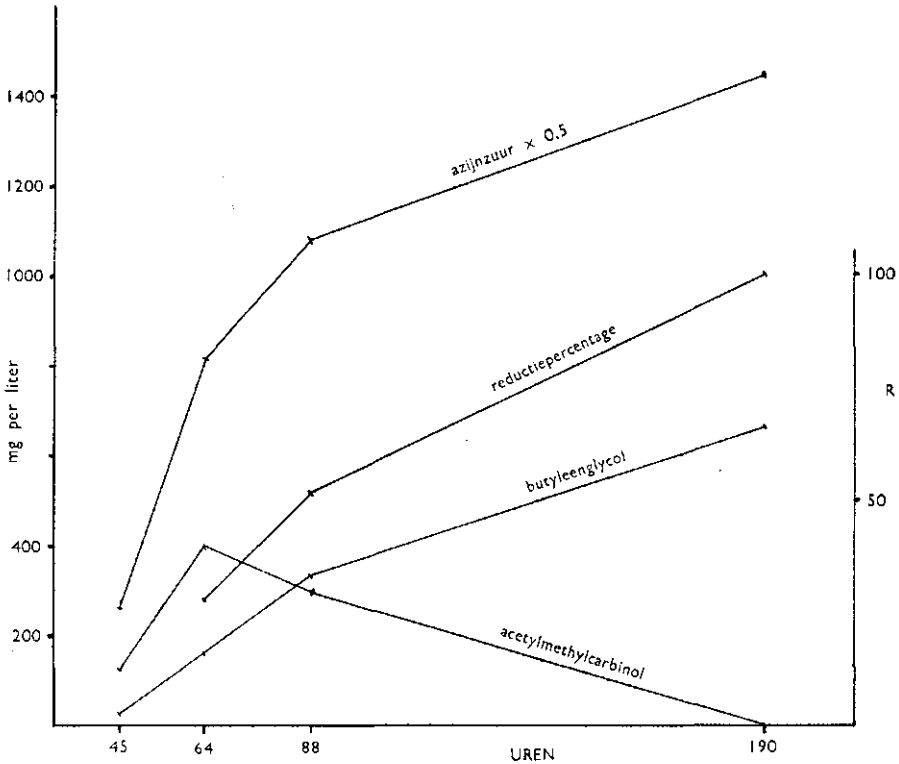


Fig. 6

Reductie van acetylmethylcarbinol door aromabetacoccus *d* in met melkzuur zuurgemaakte melk, waaraan 45 uur na de enting extra citraat werd toegevoegd

aanwezig was, 125 mg butyleenglycol is gevormd en in de kolf, waarin veel citroenzuur was, 136 mg. **De reductie is dus onafhankelijk van de aanwezigheid van citroenzuur** geweest.

In tabel en grafiek zijn tevens opgenomen de waarden van het **Reductiepercentage** R, d.i. het percentage aan C_4-producten, hetwelk in den vorm van butyleenglycol (het reductieproduct) voorkomt. Wij zullen dit begrip nog herhaaldelijk gebruiken.

Bij een tweede proef werd het extra-citroenzuur reeds bij het begin van de proef aan de melk toegevoegd. Twee kolven met elk 2 l centrifugemelk + 120 ml n/1 melkzuur + 14 g natriumcitraat werden op 14 Mei 1938 geënt met 0,1 % van een melkcultuur van resp. de aromabetacoccen *d* en 19,1. Zie hiervoor tabel 6 en figuur 7.

TABEL 6

Analyse na	Cultuur	mg per l					R
		citroen-zuur	azijnzuur	acetyl-methyl-carbinol	butyleen-glycol	C_4-producten	
2 dagen	*d*	924	1570	470	128	609	21
3 dagen	*d*	181	2100	214	436	655	67
4 dagen	*d*	0	2263	0	633	633	100
5 dagen	*d*		2311				
6 dagen	*d*		2347				
7 dagen	*d*		2405	0	624	624	100
9 dagen	*d*		2419				
3 dagen	19,1	2087	1188	250	85	340	25
4 dagen	19,1	942	1668	275	220	501	44
5 dagen	19,1	409	2011	220	311	536	58
6 dagen	19,1	132	2172	153	376	532	71
7 dagen	19,1	0	2220	85	428	515	83
9 dagen	19,1		2249	76	451	529	85

Ook bij deze tweede proef is de reductie opgetreden, al was een overmaat citroenzuur aanwezig. Wij moeten dus besluiten tot de gevolgtrekking, dat ook **als in een zuursel het citroenzuur nog niet geheel ontleed is reductie reeds kan optreden.**

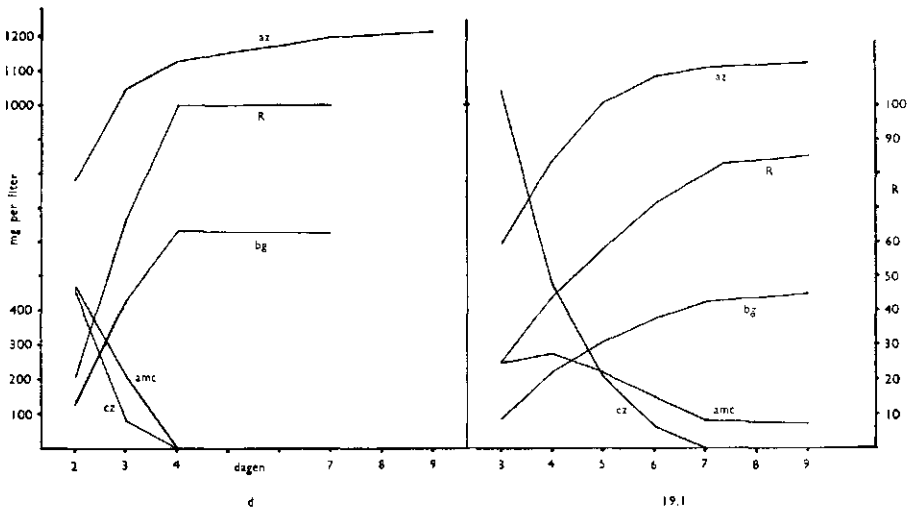


Fig. 7

Reductie van acetylmethylcarbinol door de aromabetacoccen *d* en 19,1 in met melkzuur zuurgemaakte melk, waaraan bij de enting citraat was toegevoegd
De in de figuur opgenomen waarden voor citroenzuur en azijnzuur moeten met 2 vermenigvuldigd worden

Uit tabel 6 volgt verder nog, dat de betacoccus *d* een sterker reduceerende stam is dan 19,1, doch we zien tegelijkertijd, dat de snelheid der citroenzuuromzetting onder dezelfde omstandigheden bij *d* grooter is dan bij 19,1.

Het al of niet reduceeren van het acetylmethylcarbinol in een zuursel, of algemeener gezegd, het meer of minder reduceerend vermogen van een zuursel kan afhankelijk zijn van twee factoren, nl. van de omstandigheden en van het reduceerend vermogen der in het zuursel aanwezige aromabetacoccen.

Wat de omstandigheden betreft, willen wij hier alleen nog maar wijzen op b.v. de verhouding der aantallen melkzuur- en aromabacteriën en op het meer of minder snel bereiken van een hoogen titer, eveneens op wat hier gedeeltelijk mede samenhangt, de grootere of kleinere snelheid, waarmede het citroenzuur wordt omgezet. Later komen wij hierop terug.

Het reduceerend vermogen van verschillende stammen van aromabetacoccen kan zeer verschillend zijn. In ons vorige artikel kan men hierover reeds gegevens vinden. Men kan dit verschil in reductievermogen aantoonen door de aromabacteriën onder dezelfde omstandigheden te kweeken en het verloop der kreatinereactie, d.i. het verloop van het gehalte aan acetylmethylcarbinol + diacetyl na te gaan.

In tabel 7 geven wij enkele duidelijke voorbeelden.

TABEL 7

Kreatinereacties bij aromabetacoccen, gekweekt in melk + melkzuur

Bepaald na	Aromabetacoccusstam n°.							
	2,9	7,3	18,5	19,1	33,3	34,6	35,1*a*	35,2
24 uur	—	—	—	—	—	—	—	—
48 uur	—	+++	—	+++	—	—	—	—
69 uur	++++	—	+++	+++	—	—	—	—
93 uur	—		+++	+++	++	+	++	+++
117 uur			+++	+++	+++	++	+++	++
168 uur			+++	+++	+++	—	+++	—
192 uur					+++		++	—

Voor deze bepalingen werden kolven met 100 ml melk + 6 ml n/1 melkzuur geënt met 1,6 % melkcultuur van den aromabetacoccusstam en de aldus verkregen culturen bij 21° C bewaard.

We zien hier inderdaad groote verschillen. De stammen 2,9 en 7,3 reduceeren bijzonder snel; 34,6 en 35,2 iets minder en de stammen 18,5; 19,1; 33,3 en 35,1α reduceeren niet.

Wij hadden gehoopt door isolatie van verschillende aromabacteriënstammen uit zuursel en bepaling van het reductievermogen op de wijze als in tabel 7 een indruk te kunnen krijgen van de eigenschappen van het zuursel, in de veronderstelling, dat de uit een sterk reduceerend zuursel geïsoleerde aromabacteriën in deze proef ook sterker zouden reduceeren dan die, welke uit een niet-reduceerend zuursel geïsoleerd waren. Hierin zijn wij echter niet geslaagd. Om deze proef snel te doen verloopen zou zij uitgevoerd moeten worden bij lagen zuurgraad, doch dit is onmogelijk, omdat bij een lagen zuurgraad, b.v. eenen, verkregen door per 100 ml melk 5 ml n/1 melkzuur toe te voegen, bijna alle aromabetacoccen reduceeren en bovendien bij een dergelijk lagen zuurgraad het totaal gehalte aan ontstane C_4-producten slechts gering is en dus meestal slechts een zwakke kreatinereactie te verwachten is. Het beste was het de proef bij hoogen zuurgraad uit te voeren, b.v. in melk met 7 ml n/1 melkzuur per 100 ml. Dit toch is een zuurgraad, welke beter overeenstemt met dien van zuursel. Doch hierbij ondervinden wij het bezwaar, dat de aromabacteriën, direct in een dusdanig zure vloeistof geënt, niet of pas na langen tijd aanslaan en dan verder geen reductie vertoonen. Tabel 8 geeft enkele voorbeelden van dergelijke proeven.

Door de toevoeging van het melkzuur in deze proeven pas te doen één dag na de enting der aromabacteriën om op deze wijze eerst reeds een flinken groei te krijgen, werd geen verbetering gekregen.

De kreatinereacties zijn volgens het schema van tabel 7 en 8 met zeer veel verschillende aromabacteriestammen, welke uit vele verschillende zuursels geïsoleerd waren, uitgevoerd doch **een verband tusschen het reductievermogen der afzonderlijke stammen en dat van het zuursel, waaruit zij geïsoleerd waren, werd niet gevonden.**

Omgekeerd hebben wij getracht met behulp van in deze proeven sterk reduceerende aromabacteriën zuursels samen te stellen, die krachtig reduceerden, doch het is ons niet gelukt met reinculturen van aromabacteriën en melkzuurbacteriën een reduceerend zuursel te verkrijgen. Dit doet ons concludeeren, dat bij de bewerking der reincultiveering of bij het kweeken van aromabetacoccen alleen in gesteriliseerde melk het reductievermogen voor een groot deel verloren gaat.

Wel is uit de proeven volgens tabel 7 en 8 gebleken, dat er inderdaad duidelijke verschillen in het vermogen der aromabacteriën om acetylmethylcarbinol te reduceeren aantoonbaar zijn.

TABEL 8

Kreatinereacties in met melkzuur aangezuurde centrifugemelk bij verschillende stammen van aromabetacoccen

Bacteriestam:	2,9			22,5			23,2			25,4		
ml melkzuur per 100 ml melk	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7
Na 1 dag	+	—	—	—	—	—	—	—		—	—	
„ 2 dagen	+ + +	—	—	+	—	—	+ +	—		+	+ + +	
„ 3 „	—	+ + + +	—	—	—	—	—	—	—	—	+ + +	—
„ 4 „		—	—		+ + + +	—	—	+ + +	—			
„ 5 „			+ + + +		+ + +	—		+ + +	—		+ + +	—
„ 6 „			+ +		+ + +	—						
„ 7 „			—		+ + +	—		+ + +	—		+ + +	—
„ 8 „					+ + +	—						—
„ 9 „					+ + +	—		+ + +	—		+ + +	+ + +
Bacteriestam:	26,6			27,1			28,5			28,7		
Na 1 dag	+ +	—		—			—	—		—		
„ 2 dagen	—	+ +	—	—	—		—	—	—	—	—	—
„ 3 „		+ +	—	+ +	—	—	+ + +	—	—	+ +		
„ 4 „		+ +	+	+ +	—	—	+ + +	—	—	+ +	—	—
„ 5 „		+ +	+ +	+ +	—	—	+ + +	—	—	+		
„ 6 „		+	+ +	+ +	+ +	—	+ + +	+ + +	—	+	—	—
„ 7 „		+	+ +	+ +	+ + +	—	+ + +	+ + +	—	+	—	—
„ 8 „		+	+ +	+ +	+ + +	—	+ + +	+ + +	—	+	—	—
„ 9 „					+ + +	—	+ + +	+ + +	—	+	+	—
„ 10 „							+ + +	+ + +	—	+	+ + +	—

TABEL 9

Zuursel	Oorspronkelijk zuursel					0,0067 % enting						
	Titer per 100 g	Kreatinereactie		mg/l citroenzuur	% aromabact.	Kreatinereacties na				Citroenzuur verdwenen na of tusschen	azijnzuur	m acet meth carbi
		aank.	na 24 uur			24 u.	40 u.	48 u.	64 u.			
26	104,0	—	—	—	16	±	+++	++(+)		64 u.	924	19
27	104,4	—	—	—	6	—	++	—		40 u.	972 1061	9
28	112,4	+(+)	—	—	18	—	++(+)	+	—	40 u.	912 962	10
29	100,8	+	—	—	8	—	++	+	—	40 u.	932 1042	11
30	76,8	+	++	1224	10	—	+++	+++		40 u.	845 971	17 8
31	103,2	—	—	—	4	—	—	—	—	136 en 160 u.	902	18
32	105,6	—	—	—	4	—	+(+)	++	—	40 en 64 u.	949 974	8
33	91,2	+(+)	+	544	8	—	++	+++	++	40 en 64 u.	902 960	11 2
34	100,0	—	—	—	8	—	+	(+)	—	40 en 64 u.	952 955	
35	90,8	—	+++	+	2	—	++	++	+++(+)	64 en 88 u.	826	27 20
36	88,0	—	—	—	2	±	++(+)	++++	+++	40 en 64 u.	874 941	14 4
37	100,8	+++	+++	—	10	±	++(+)	++(+)		40 u.	810 905	16 4
38	98,0	—	+	+	0	—	+(+)	++(+)	+++	64 en 112 u.	780	16
41	112,8	—	—	—	8	—	+(+)	+(+)	++	136 en 160 u.	853 924	22 17
42	110,0	—		—	2	—	(+)	+(+)	+++	40 en 64 u.	763 882	18 8
43	111,2	—		—	22	—	(+)			40 u.	924 991	8
44	116,8	—		—	16	—	++(+)	(—)		40 u.	899 1006	9
45	95,2	++(+)		±	14	—	+++	+++(+)	(—)	40 en 64 u.	904 952	3
46	116,0	—		—	22	(+)	+++	+++		40 u.	877 1001	17 6
47		—			42	(—)	+	—		40 u.	947 1006	2
M 1						—	++(+)	++(+)	+++	40 en 64 u.	878 929	27 28

OPMERKINGEN:

Kreatinereactie der 0,0067 % enting van zuursel 31: na 88 uur —
„ „ 0,0067 % „ „ „ 31: „ 136 „ +++
„ „ 0,0067 % „ „ „ 31: „ 160 „ +++(+)
„ „ 0,0067 % „ „ „ 41: „ 160 „ ++++

(28) C 28

			2 % enting									
			Kreatinereacties na				Citroenzuur verdwenen na of tusschen	mg/l				
uty-en-ycol	C_4-producten	R	24 u.	40 u.	48 u.	64 u.		azijnzuur	acetylmethylcarbinol	butyleenglycol	C_4-producten	R
89	304	31	—	—	—		18 u.	1822				
158	255	62	—	—	—		40 u.	1192	0	156	156	100
251	251	100										
117	223	52	+	—	—		40 u.	984	0	231	231	100
255	255	100										
123	245	50	++(+)	+	+	—	40 u.	950	146	141	290	49
277	277	100						1073	0	304	304	100
63	244	26	++	+++	+++	++	40 u.	905	253	47	306	15
191	275	69						950	153	110	266	41
106	299	35	—	—	—	—	40 en 64 u.	1438	40	40	81	49
								1507	64	34	99	34
244	334	73	—	+(+)	—	—	40 en 64 u.	1070	0	259	259	100
295	295	100						1085	0	259	259	100
137	259	53	++(+)	+(+)	(+)		40 u.	941	122	198	322	61
268	296	92						1008	9	254	263	97
187	187	100	+(+)	+	—		40 u.	938	61	157	219	72
241	241	100						1021	0	196	196	100
71	355	20	+	+++	+++	+++(+)	40 u.	817	278	71	355	20
144	352	41						870	215	120	340	35
99	251	39	+(+)	++(+)	+++(+)		40 u.	892	188	48	240	20
194	241	80							85	171	258	66
78	244	32	++	++(+)	++(+)		40 u.	840	191	79	274	29
176	217	81						913	49	167	217	77
109	277	40	—	(+)	+	++	64 en 112 u.	1055	85	75	162	46
								1050	82	98	182	54
58	286	20	++	++(+)	++(+)	++	40 en 64 u.	912	125	102	229	44
120	295	41						977	82	132	216	61
75	259	29	(+)	+(+)	+(+)	++	40 en 64 u.	910	168	153	325	47
209	293	71						915	31	244	276	89
143	196	73	++	—			40 u.	966	31	195	227	86
96	196	100						1024	0	232	232	100
132	226	59	++(+)	—	—		40 u.	1036	0	232	232	100
205	205	100						1051	0	237	237	100
128	264	86	+++(+)	++	+(+)		40 u.	909	113	194	310	62
168	268	100						914	0	313	313	100
72	253	28	(+)	+(+)	+		40 u.	982	49	100	150	67
161	224	72						1078	0	174	174	100
158	179	88	++++	+(+)	—		40 u.	997	31	181	213	85
165	165	100						1054	0	214	214	100
26	310	9	++	++	+		40 u.	893	241	40	286	14
142	329	13						982	238	46	289	16

Kreatinereactie der 2 % enting van zuursel 31: na 88 uur ++(+)
„ „ „ 2 % „ „ „ 31: „ 136 „ —
De cijfers voor de hoeveelheden C_4-producten zijn berekend als butyleenglycol.

4. Het reductieverschijnsel bij practijkzuursels

Bij de tweede reeks van 20 uit de practijk ontvangen zuursels, alsmede van ons eigen zuursel M 1, werd op grond van de ervaringen, opgedaan bij de eerste reeks, een andere serie bepalingen verricht. Na aankomst van het zuursel werd dit met 0,0067 % en met 2 % geënt in gesteriliseerde centrifugemelk. Deze culturen werden bewaard in een waterbad van 21° C. Nadat het citroenzuur in deze culturen was omgezet, werden bepalingen gedaan van het gehalte aan acetylmethylcarbinol (+ diacetyl), butyleenglycol en azijnzuur. Een week later werden deze bepalingen wederom uitgevoerd om de in dien tijd plaats gehad hebbenden veranderingen na te gaan. Overigens werd nog een aantal gegevens verzameld, gelijk dit ook in de eerste reeks geschiedde, nl. titer, citroenzuur en kreatinereactie van het pas ontvangen zuursel, de kreatinereactie hiervan 24 uur later en kreatinereacties op verschillende tijdstippen in de geënte melkculturen, alsmede het percentage aromabacteriën in de flora, zooals dit door afenten van 50 koloniën van weigelatine gevonden werd.

In tabel 9 worden de uitkomsten opgesomd, die wij hieronder aan de hand der tabel nader bespreken. De cijfers van de analyse na 1 week zijn in de tabel onder de eerst bepaalde geplaatst.

De ontvangen zuursels. Wat betreft den zuringstoestand, waren de zuursels 30, 33, 35, 36 en 45 bij aankomst nog niet geheel uitgerijpt. Uit een oogpunt beschouwd van de werking der aromabetacoccen waren, blijkens het citroenzuurgehalte, de zuursels 30, 33, 35, 38 en 45 nog niet geheel rijp. Daar de meeste van de hier genoemde zuursels in beide opzichten onrijp waren, volgt hieruit, dat zij in een zeer jong stadium verzonden werden.

Bij bijna alle ingekomen zuursels was de kreatinereactie negatief of werd spoedig negatief. Alleen bij de zuursels 30 en 35 werd een duidelijke toename van de kreatinereactie na de aankomst geconstateerd, doch bij deze was toen de citroenzuurontleding nog in vollen gang. Zelfs het zuursel 33, dat toch bij aankomst nog vrij veel citroenzuur bevatte, vertoonde in 24 uur tijd een teruggang der kreatinereactie. We kunnen dus op grond der uitgevoerde kreatinereacties wel zeggen, dat bijna alle zuursels reductie van acetylmethylcarbinol vertoonden.

Het percentage in het zuursel gevonden aromabacteriën vertoont niet veel verband met de gevonden eigenschappen.

De 0,0067 % *enting.* De hoeveelheid C_4-producten, welke bij de ontleding van het citroenzuur ontstaat en welke maximaal 0,5 molecule per 1 molecule citroenzuur kan bedragen, d.i. in melk met 0,2 % citroenzuur 425 mg, berekend

als butyleenglycol, loopt bij de reeks zuursels uiteen van 165 tot 355 mg per l (eveneens berekend als butyleenglycol). Tusschen de cijfers, welke direct na het verdwijnen van het citroenzuur en die, welke 1 week later bepaald werden, is dikwijls eenig verschil. Er blijkt echter duidelijk, dat in groote trekken het totaal aan C_4-producten niet veranderd is in dien tijd. Volgens onze opvattingen over de citroenzuurontleding moet een lager gehalte aan C_4-producten overeenkomen met een hooger gehalte aan azijnzuur. Bij een verschil in C_4-producten van 135 mg/l kan het verschil in azijnzuur slechts 90 mg/l bedragen. Daar wij er reeds meermalen op gewezen hebben, dat de totale hoeveelheid azijnzuur niet alleen uit het omgezette citroenzuur afkomstig is, zullen we dus niet kunnen verwachten, dat het theoretische verband tusschen C_4-producten en azijnzuur, hetwelk wel bestaat bij verschillende proeven, die met eenzelfden aromabacteriënstam uitgevoerd worden, bij zuursels van zoo verschillende herkomst streng tot uiting komt.

Blijkens tabel 10 is de gemiddelde strekking duidelijk in de verwachte richting.

TABEL 10

Zuursels	C_4-producten	Azijnzuurgemiddelden	
		direct	na 1 week
26, 31, 32, 35 en 41	290—353 mg	891	949
33, 38, 42, 45, 29 en 30	260—277 „	855	961
27, 36, 28, 46 en 37	230—253 „	890	974
44, 34, 43 en 47	172—215 „	931	990

Vooral is dit het geval bij de azijnzuurgehalten na 1 week (laatste kolom) als de culturen hun eindtoestand bereikt hebben.

Bezien wij thans de reductie. Deze is uitgedrukt in den factor R, het z.g. reductiepercentage. We rangschikken enkele belangrijke cijfers in tabel 11.

TABEL 11

Zuursel	R		C_4-producten	Zuursel	R		C_4-producten
M 1	9	13	320	29	50	100	261
35	20	41	353	28	52	100	239
41	20	41	290	33	53	92	277
30	26	69	260	44	59	100	215
46	28	72	239	27	62	100	253
42	29	71	275	32	73	100	315
26	31		304	43	73	100	196
37	32	81	230	45	86	100	266
31	35		299	47	88	100	172
36	39	80	246	34	100	100	214
38	40		277				

Onder R staan 2 kolommen cijfers. De eerste kolom geeft het reductiepercentage, direct na het verdwijnen van het citroenzuur, de 2de na een week.

Daaruit blijkt, dat na 1 week in 18 van de 21 zuursels meer dan de helft van de C_4-producten in den vorm van butyleenglycol aanwezig was en dat bij ongeveer de helft der zuursels de geheele hoeveelheid C_4-producten in den gereduceerden vorm gebracht was. Hier 'is in cijfers uitgedrukt hoe sterk de meeste practijkzuursels diacetyl en acetylmethylcarbinol reduceeren. Bij de helft der zuursels is zelfs reeds 50 % of meer der C_4-stoffen tot butyleenglycol gereduceerd als het citroenzuur nog pas ontleed is, waarbij dus nogmaals zichtbaar is, dat de reductie zoowel tijdens als na de citroenzuurvergisting plaats grijpt.

Uit de cijfers volgt bovendien, dat de „reductieactiviteit" der aromabacteriën in het zuursel direct aanwezig is. Een zwakke reductie in den aanvang blijft ook later een zwakke reductie en een sterke reductie in de eerste phase blijft zich handhaven, nadat het citroenzuur verdwenen is. De figuur 8 maakt dit zichtbaar.

Het zou nu misschien voor de hand liggen om, gezien het feit, dat wij weten dat het reductievermogen der aromabacteriën heel verschillend kan zijn, de meer of minder sterke reductie in de onderzochte practijkzuursels toe te schrijven aan verschillen in het reductievermogen van de aromabacteriën in de verschillende zuursels. Een dergelijke verklaring evenwel mogen wij niet dadelijk uit de cijfers afleiden. Als wij de in tabel II eveneens opgegeven cijfers voor het gehalte aan C_4-producten, welke uit het citroenzuur gevormd zijn, vergelijken met het reductiepercentage R, zooals in fig. 9 gedaan is, dan zien wij, dat in groote trekken bij een hooger reductiepercentage een lager gehalte aan C_4-producten behoort. De punten liggen niet dicht om een lijn gegroepeerd; er is veel spreiding, doch wij moeten daarbij bedenken, dat de eerste analyses, die in de zuursels gedaan werden, nl. toen het citroenzuur pas verdwenen was, niet alle op precies het juiste oogenblik gedaan werden. De eene analyse zal b.v. gedaan zijn 1 uur na het volledig omzetten van het citroenzuur, de andere 2 of meer uren daarna. Ook zijn er enkele uitzonderingen in de strekking van fig. 9, b.v. de zuursels 32, 45 en 34, die een sterkere reductie vertoonen dan de andere zuursels, doch het totale verband tusschen reductiepercentage en hoeveelheid C_4-stoffen is toch aanwezig.

Nu is ons uit onze onderzoekingen met reinculturen van aromabetacoccen bekend, dat de hoeveelheid C_4-producten, die een aromabacterie vormt, grooter is naarmate de zuurgraad van het milieu hooger is. Vindt men dus bij een zuringsproces, waarbij de aromabacteriën werkzaam zijn bij een niet-constanten, doch steeds toenemenden zuurgraad, bij het eene zuursel een

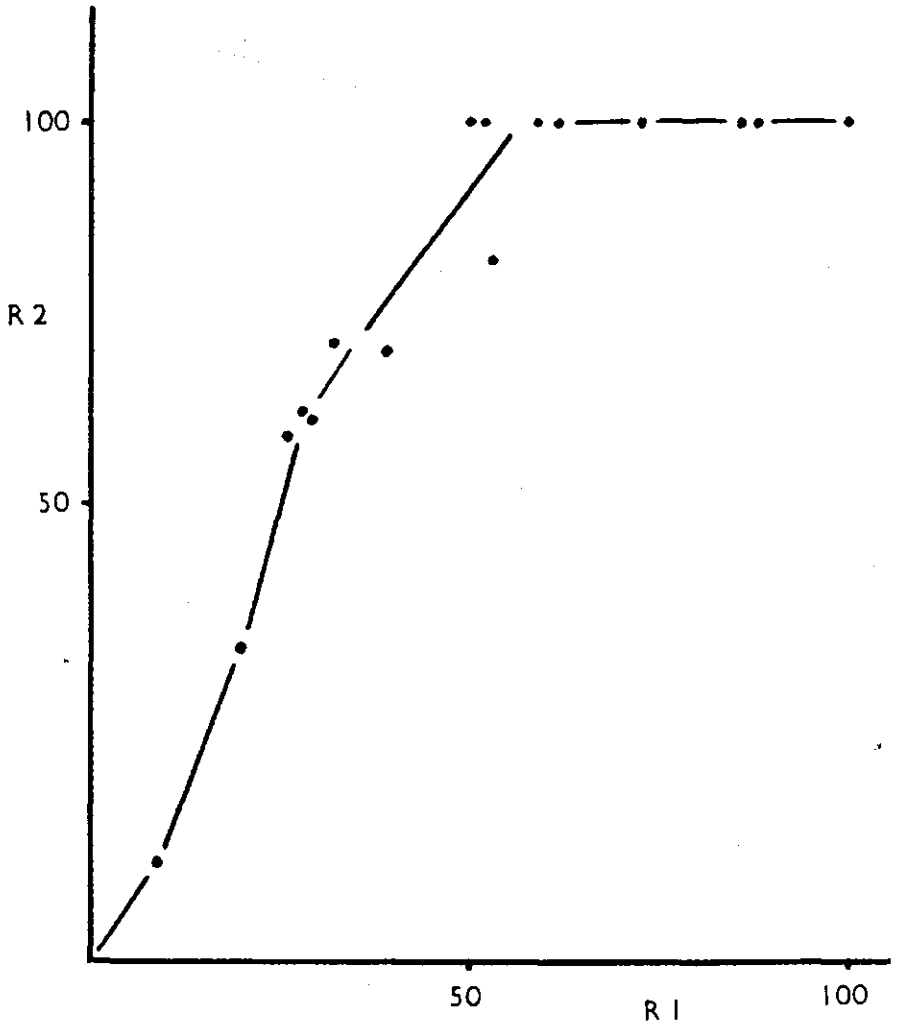


Fig. 8

Verband tusschen het reductiepercentage, bepaald na de omzetting van het citroenzuur (R 1) en 1 week later (R 2) bij practijkzuursels

geringere productie van C_4-stoffen dan bij het andere, dan moet dit beteekenen, dat in het eene zuursel de ontstane C_4-stoffen bij lageren zuurgraad geproduceerd werden dan in het andere zuursel, m.a.w. dat in het eene zuursel het citroenzuur sneller werd ontleed dan in het andere zuursel.

We kunnen dus de totale hoeveelheid geproduceerde C_4-stoffen beschouwen als een maat voor de snelheid, waarmede het citroenzuur ontleed wordt, in dien zin, dat een hoog gehalte aan C_4-stoffen met een geringe citroenzuur-

ontledingssnelheid overeenkomt en een laag gehalte met een groote ontledingssnelheid. Dit toepassende kunnen wij dus de fig. 9, die laat zien hoe het reductiepercentage van het totaal C_4-gehalte afhangt, ook beschouwen als een verband

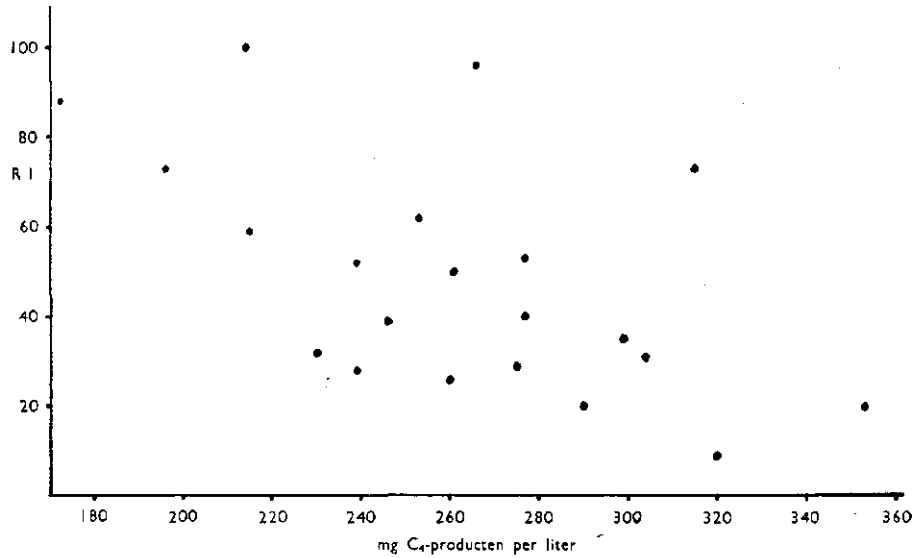


Fig. 9

Verband tusschen reductiepercentage, bepaald na het verdwijnen van het citroenzuur, en de totale hoeveelheid ontstane C_4-producten bij de practijkzuursels 26—47

aan te geven tusschen reductiepercentage en citroenzuurontledingssnelheid. Dan leert de figuur ons, dat een grootere citroenzuurontledingssnelheid samengaat met een sterkere reductie.

Op deze wijze gezien wordt het verschil in reductievermogen van de zuursels dus teruggebracht tot de activiteit in het algemeen van de aromabacteriën en luidt de conclusie: **Hoe actiever de aromabacteriën in een zuursel zijn, des te sneller wordt het citroenzuur ontleed, des te minder C_4-stoffen worden gevormd en des te sterker zal de reductie zijn.**

In een later hoofdstuk zullen wij gelegenheid hebben op deze uitspraak terug te komen.

Vergelijken we thans de uitkomsten der kreatinereacties met de reductiepercentages. Voor een practische uitvoering van het zuurselonderzoek is het niet wel doenlijk citroenzuur-, acetylmethylcarbinol- en butyleenglycolbepalingen uit te voeren. Het onderzoek met de kreatinereactie is veel eenvoudiger en sneller. Men kan zich daarbij niet tevreden stellen met één bepaling, doch behoort gedurende enkele dagen het verloop der reactie te

vervolgen. De in verloop van dien tijd bereikte maximale sterkte geeft een denkbeeld van de hoeveelheid gevormd acetylmethylcarbinol en de snelheid, waarmede de reactie daarna afneemt zegt iets omtrent de reductie. In tabel 9 zijn volgens de kreatinereactie de zuursels 27, 32, 34, 44, 45 en 47 het snelst reduceerend en dit zijn juist de zuursels met het hoogste reductiepercentage (zie tabel 11). Volgens de kreatinereactie reduceeren de zuursels 35, 36, 38, 41, 42 en M 1 nauwelijks en deze hebben inderdaad lage reductiepercentages. Hieruit moge blijken, dat **de kreatinereactie zeer goed bruikbaar is voor het onderzoek van zuursels.**

De 2 % *enting.* Bij deze reeks zuursels waren er slechts 2 met een abnormaal hoog azijnzuurgehalte, nl. 26 en 31. Bij de zwakke 0,0067 % enting kwam dit verschijnsel niet voor, wat het hierboven in hoofdstuk B 2 gezegde bevestigt. Zonderen wij deze 2 zuursels uit, dan blijkt weer, evenals bij de zwakke enting, in groote lijnen het azijnzuurgehalte hooger te zijn bij zuursels, waarvan het gehalte aan C_4-producten lager is (zie tabel 12).

TABEL 12

Zuursels	C_4-producten	Azijnzuurgemiddelden	
		direct	na 1 week
35	347 mg	817	870
45, 42, 29, 33 en 30	286—311 mg	923	972
32, 36, 37, 44, 28, 43 en 41 . . .	222—259 „	957	1010
47 en 34	207—213 „	967	1037
38, 46 en 27	156—172 „	1076	1064

Daar bij de zwaardere enting van 2 % een snellere werking plaats heeft, worden fouten, veroorzaakt door bepalingen op niet vergelijkbare oogenblikken, grooter, zoodat wij hier niet zoo zorgvuldig het verband tusschen de reductie eerst en later en het verband tusschen reductie en gehalte aan C_4-producten willen bepalen. Het verband is op dezelfde wijze als in de figuren 8 en 9 aanwezig, doch de spreiding is grooter.

Beoordeeld volgens de op achtereenvolgende dagen gedane kreatinereacties, zouden wij de zuursels op de volgende wijze verdeelen, hetgeen uitstekend overeenkomt met de bepalingen der reductiepercentages:

	R.
Volgens kreatinereactie sterk reduceerend 27, 28, 32, 43, 44	86—100
„ „ vrij sterk reduceerend 29, 34, 45, 47	49—85
„ „ reduceerend 33, 46	
„ „ weinig reduceerend 30, 35, 36, 37, 38, 41, 42, M 1	14—47

Ook hier zien wij dus weer **de bruikbaarheid van de op achtereenvolgende dagen uitgevoerde kreatinereacties voor het op eenvoudige wijze beoordeelen van het reductievermogen.**

5. De activiteit der aromabacteriën

Nu we in het vorige hoofdstuk het begrip „activiteit" hebben ontwikkeld naar aanleiding van de resultaten van het onderzoek der practijkzuursels, willen wij dit begrip thans nader bespreken. Bij de practijkzuursels werden genoemd de „reductieactiviteit" en de „citroenzuuromzettingssnelheid" en het bleek, dat deze 2 factoren van elkaar afhankelijk waren, zoodat wij op grond daarvan de invloed van beide factoren samenvatten onder den naam „activiteit".

Zal deze activiteit nu nader onderzocht worden, dan is het gewenscht dit te doen met reinculturen, omdat in zuursels zooveel verschillende factoren aanwezig zijn, dat het resultaat vertroebeld zou worden. Wil men de proeven doen met reinculturen, dan dient men dus naar willekeur te kunnen beschikken over bacteriën met activiteitsverschillen en het bleek tijdens het onderooek, dat door de reinkweeking de activiteit zóó sterk vermindert, dat het ons b.v. nooit gelukte om een zuursel samen te stellen, dat een zóó sterke reductie vertoonde, als met de verschillende graden van reductie, welke wij bij practijkzuursels gevonden hadden, maar eenigszins overeenkwam.

Daarom moest met de reinculturen op andere wijze worden gehandeld. Daar een verhoogde activiteit zich uit in een vergroote citroenzuuromzettingssnelheid, konden wij ons doel, een grootere activiteit te krijgen, verwezenlijken door deze snelheid op kunstmatige wijze te vergrooten. Dit kon niet door temperatuurverhooging geschieden, omdat daarbij ook de melkzuurstreptococcen hun werkzaamheid versnellen en het er hier juist om gaat de snelheid van citroenzuurontleding ten opzichte van den tijdens het zuringsproces stijgenden zuurgraad te veranderen. Wij moesten dus te werk gaan met wisselende verhoudingen in de enthoeveelheid van melkzuurstreptococcen en aromabetacoccen om een verhoudingsgewijs snellere of langzamere citroenzuurvergisting te veroorzaken.

Op 23 Januari 1939 werd een eerste dergelijke proef uitgevoerd in 4 kolven met centrifugemelk. In kolf I werd geënt een reeds eenigen tijd eerder samengestelde mengcultuur van melkzuurbacteriën en aromabetacoccen, in kolf II 0,02 % van een één dag oude cultuur van deze melkzuurstreptococcen en 0,02 % van een 4 dagen oude melkcultuur van deze aromabetacoccen, in kolf III 0,02 % melkzuurbacteriëncultuur en 1 % aromabacteriëncultuur en in kolf IV, waarin reeds 8 uur eerder 1 % aromabacteriëncultuur geënt was, 0,02 % melkzuurbacteriëncultuur.

De resultaten zijn opgegeven in tabel 13. De bepalingen van de hoeveelheden der gistingsproducten werden uitgevoerd korten tijd nadat geconstateerd werd, dat het citroenzuur was ontleed.

TABEL 13

Kolf	Kreatinereactie na					citroenzuur ontleed binnen	mg per l				R
	42 u.	65 u.	73 u.	89 u.	160 u.		azijnzuur	acetyl-methyl-carbinol	butyleen-glycol	C_4-pro-ducten	
I	+++	+++(+)	+++	+++	++(+)	66 u.	832	265	77	348	22
II	+(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	90 u.	847	259	84	349	24
III	+(+)	—	—			43 u.	972	56	186	243	77
IV	—					43 u.	1045	0	57	57	100

De uitkomsten van deze proef zijn volgens verwachting. In de kolven II, III en IV is de reductie sterker naarmate de aromabacteriën ten opzichte van de melkzuurbacteriën sterker in de meerderheid waren en dus het citroenzuur ook sneller werd omgezet. Dan is dus ook het gehalte aan C_4-producten (het totaal aan acetylmethylcarbinol en butyleenglycol omgerekend op butyleenglycol) lager. Tevens zien wij bij deze proef met reinculturen, dat de reciprociteit van azijnzuur en C_4-producten weer duidelijk zichtbaar is.

De proef van tabel 13 werd nog eens op andere wijze herhaald met dezelfde bacteriestammen, die uit zuursel 51 geïsoleerd waren. Bij deze proef, genomen op 1 Februari 1939, werden 3 kolven, A, B en C, geënt met 0,02 % van een melkzuurbacteriëncultuur. In de kolven B en C werd resp. 1 % en 0,02 % aromabacteriëncultuur gelijktijdig geënt, doch kolf A was reeds 3 uur eerder met 1 % aromabacteriëncultuur geënt. Op verschillende tijdstippen werden analyses gemaakt om, behalve het eindresultaat, ook het verloop van de gisting te kunnen vervolgen. De resultaten hiervan zijn opgesomd in tabel 14 en grafisch voorgesteld in de figuren 10a, 10b en 10c.

Het eindresultaat in de verschillende kolven, bepaald eenigen tijd nadat het citroenzuur volledig ontleed was, komt overeen met dat van tabel 13. De reductiepercentages zijn wederom hooger, resp. 29, 61 en 88 %, naarmate het citroenzuur eerder ontleed is, d.w.z. naarmate meer aromabacteriën tegelijkertijd ten opzichte van de melkzuurbacteriën aanwezig waren.

De resultaten van deze proef worden daarom zoo uitgebreid vermeld, daar zij onze onderzoekingen over de citroenzuurvergisting door de aroma-

TABEL 14

Kolf	Kreatinereactie na					Analyse na	mg per l					R
	21 u.	24½ u.	43 u.	49 u.	104 u.		citroenzuur	azijnzuur	acetylmethylcarbinol	butyleenglycol	C_4-producten	
A	—	+(+)	—			19 u.	948					
						21 u.	595	636	28	38	66	
						24½ u.	110	934	101	69	171	40
						48 u.	0	1091	27	209	237	88
B	—	++	+(+)	(+)		19 u.	1198					
						21 u.	963	501	67	5	73	7
						24½ u.	299	723	137	42	182	23
						48 u.	0	1014	130	198	330	61
C		—	++	+++(+)	+++	20 u.	1668	192	30	0	31	0
						25 u.	1556	277	61	0	63	0
						67 u.	0	917	227	92	325	29

betacoccen zoo duidelijk bevestigen. Bij het nauwkeurig bezien van de figuren 10a en 10b kan men opmerken, dat de hellingshoeken der lijnen, die de

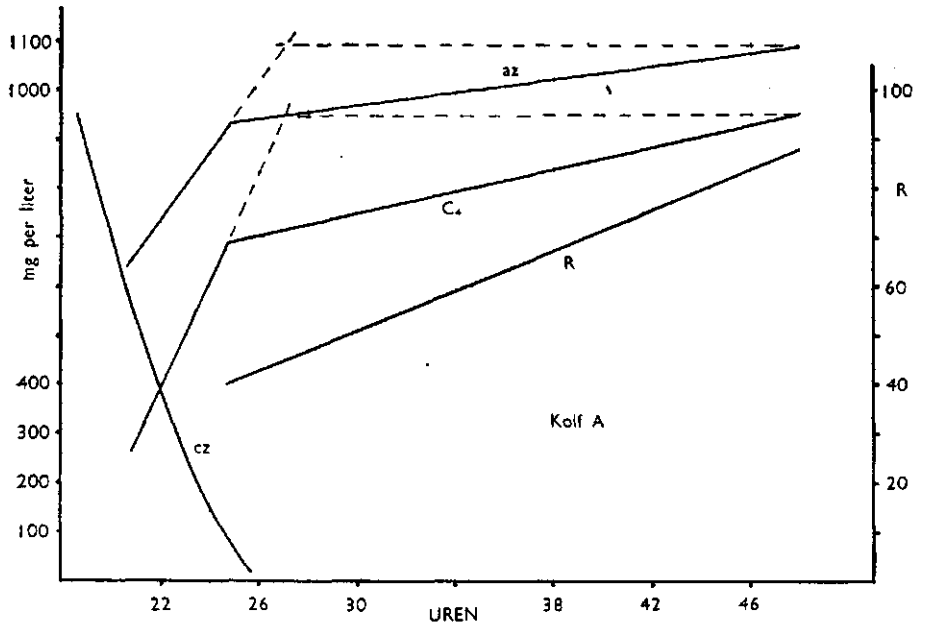


Fig. 10a

Citroenzuurontleding, vorming der gistingsproducten en reductie in culturen van melkzuur- en aromabacteriën, in verschillende verhoudingen met elkaar in melk geënt.
In de 3 grafieken is het gehalte aan C_4-producten met 4 vermenigvuldigd

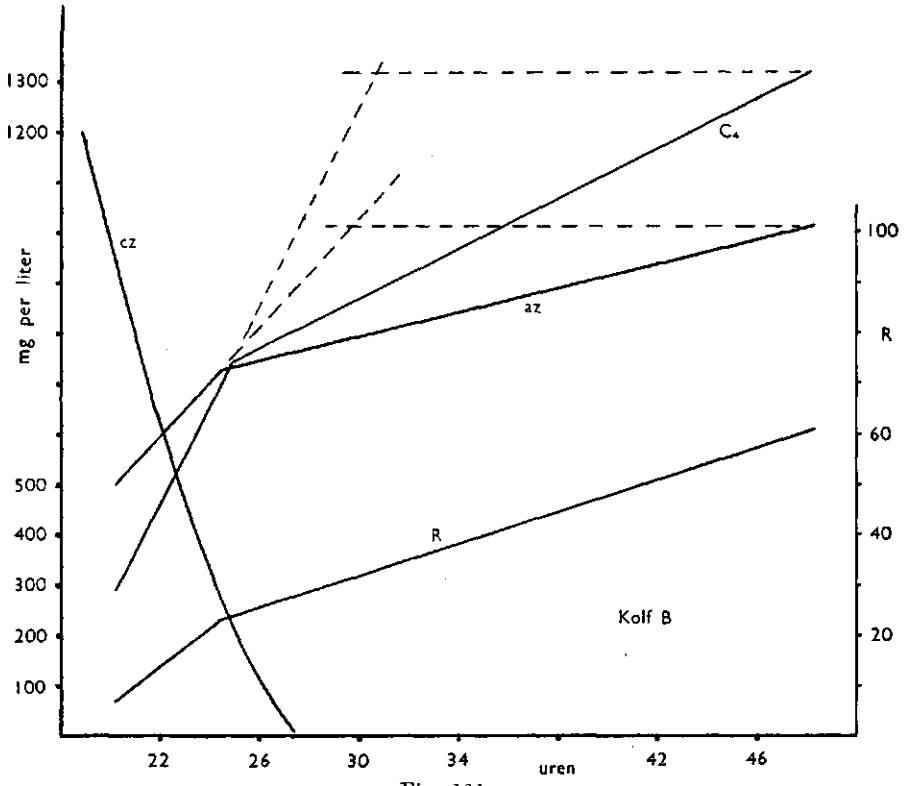


Fig. 10b

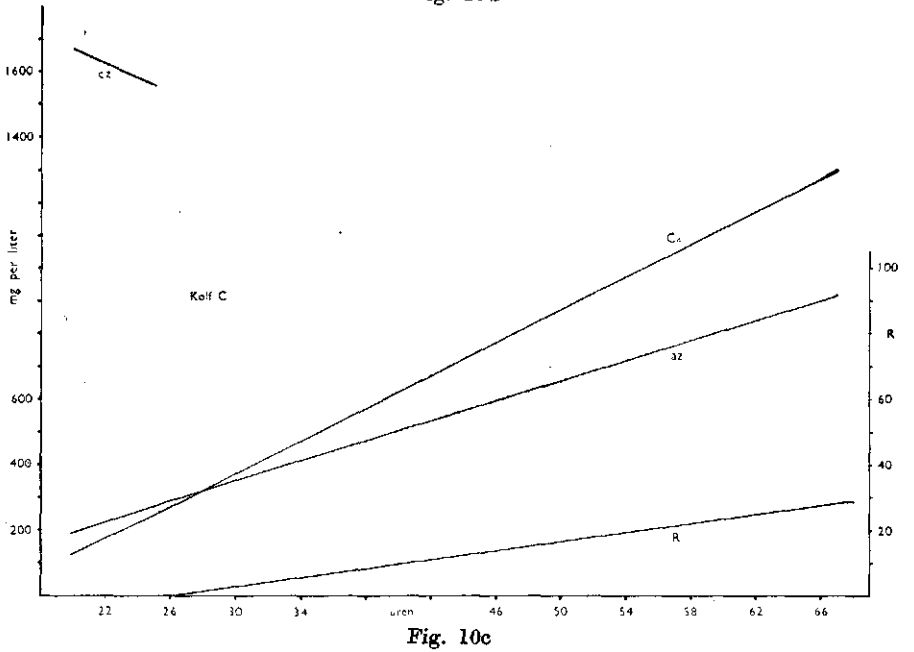


Fig. 10c

vorming van azijnzuur en C_4-producten in de kolven A en B voorstellen, in den loop der proef sterk veranderen en hoewel de hoeveelheid dezer stoffen niet van uur tot uur vervolgd kon worden, kan men toch afleiden, dat deze lijnen een knik moeten vertoonen ongeveer op het tijdstip, dat het citroenzuur volledig ontleed is. Dit blijkt b.v. als men een horizontaal trekt door de 3de bepaling en de lijn tusschen 1ste en 2de bepaling verlengt; zij snijden elkaar dan op het tijdstip, dat het citroenzuur verdwenen is. Bij de kolf C ziet men dit niet, daar hier de citroenzuuraantasting zoo langzaam verliep.

De in de kolven A, B en C samengestelde zuursels werden eenigen tijd iederen dag overgeënt met 0,1 % en op 8 Februari 1939 werd met deze overentingen eenzelfde proef uitgevoerd. Wij verwachtten, dat nu geen groot verschil meer tusschen deze 3 culturen zou bestaan. Het verschil was nl. op kunstmatige wijze aangebracht en door de vele overentingen zou de aangebrachte wanverhouding tusschen aroma- en melkzuurbacteriën zich verplaatsen in de richting van het natuurlijk evenwicht tusschen de 2 bacteriesoorten. Inderdaad bedroegen bij deze proef de reductiepercentages dan ook resp. 42, 40 en 43 %.

Wij hebben dus kunnen aantoonen, dat bij een snellere citroenzuuromzetting een sterkere reductie plaats grijpt. Deze proeven kunnen echter alleen slagen als hierbij aromabacteriënstammen gebruikt worden, die reductievermogen bezitten. Bezigt men hiervoor stammen met eèn zeer gering reductievermogen, dan zal het eenige resultaat van zoo'n proef bestaan in een verschillende opbrengst aan C_4-producten. Nu bezaten wij in onze reincultuurcollectie enkele aromabetacoccenstammen met een zeer gering reductievermogen. Ook met deze is bovenomschreven proef gedaan, waarbij in 2 kolven melk 0,01 % van een melkzuurbacteriëncultuur geënt werd en in de eene, A, 1 % aromabacteriëncultuur (stam *a* 1); in de andere, B, 0,05 %. Zie tabel 15.

TABEL 15

Kolf	Kreatinereactie na				mg per 1				R
	21 u.	26 u.	74 u.	173 u.	azijnzuur	acetyl-methyl-carbonil	butyleen-glycol	C_4-producten	
A	(+)	++(+)	+++(+)	++	804	244	2	252	1
B			++++	+++	775	271	6	286	2

Ook bij deze proef werd de citroenzuuromzetting vervolgd. Tusschen het tijdstip, dat in de zurende cultuur een titer van 80 ml n/10 per 100 g bereikt werd, en 8 uren daarna werd in kolf A 500 mg citroenzuur ontleed en in kolf C 180. Hoewel dus de citroenzuuromzettingssnelheid groote verschillen vertoonde en daardoor in de eene kolf meer C_4-producten ontstonden dan in de andere, is er ook in kolf A geen reductie opgetreden. Hoewel dus de aromabetacoccus *a* 1 in reincultuur nog wel eenige reductie vertoont bij lagen zuurgraad, komt het reductievermogen van deze bacterie in een zuursel in het geheel niet meer tot zijn recht.

TABEL 16

Melk geent met 0,01 % *van een melkzuurbacteriencultuur en* 1 % *of* 0,5 % *van een cultuur van de aromabacterien a* 1 *en d*

Kolf met	Kreatinereactie na		Analyse na	mg per l					R
				citroenzuur	azijnzuur	acetylmethylcarbinol	butyleenglycol	C_4-producten	
1 % *a* 1	50 u.	++(+)	18¾ u.	1014					
	74 u.	++(+)	20¾ u.	715	525				
	98 u.	++	21¾ u.			82	20	104	
	117 u.	++	23 u.	301	652				
	168 u.	++(+)	25¾ u.	122	868	183	15	202	7
			43½ u.	0	851	168	27	199	14
1 % *d*	50 u.	+++	18¾ u.	1306					
	74 u.	+++	21 u.		343				
	98 u.	++(+)	23½ u.	799	451	116	17	136	
	117 u.	++(+)	26 u.	487	574				
	168 u.	+++	32½ u.	135	722	241	17	263	6
			48 u.	0	842	220	46	271	16
0,5 % *d*	50 u.	+++	19 u.	1374					
	74 u.	+++	21¼ u.		338				
	98 u.	++(+)	24¾ u.	759	473	137	6	146	
	117 u.	+++	26½ u.		557				
	168 u.	+++	32¾ u.	204	672	232	8	245	3
			47¾ u.	0	788	256	32	294	11

Bij een volgende proef, van 20 Maart 1939, werd ook de aromabetacoccus *d* gebruikt. In reincultuur vertoont deze een duidelijke reductie, ook wel bij hoogere zuurgraden, b.v. in melk met 6 ml n/1 melkzuur per 100 ml. Uit tabel 16 blijkt, dat ook deze stam in de omstandigheden van een zuursel

bijna geen reductie vertoont. Van deze proef is een uitgebreidere analyse verricht om, evenals bij de proef van tabel 14, te demonstreeren, dat het ontstaan der gistingsproducten azijnzuur en C_4-stoffen van de citroenzuurvergisting afhangt.

De resultaten zijn grafisch voorgesteld in fig. 11.

De punten der gevonden cijfers zijn verbonden door rechte lijnen. Hoewel de aldus ontstane vormings- en ontledingslijnen niet geïdealiseerd zijn door gebogen lijnen te teekenen, volgt toch duidelijk uit de figuur, juist zooals bij fig. 10 en bij fig. 7, dat na de ontleding van het citroenzuur de C_4-producten en het azijnzuur niet of nauwelijks meer toenemen.

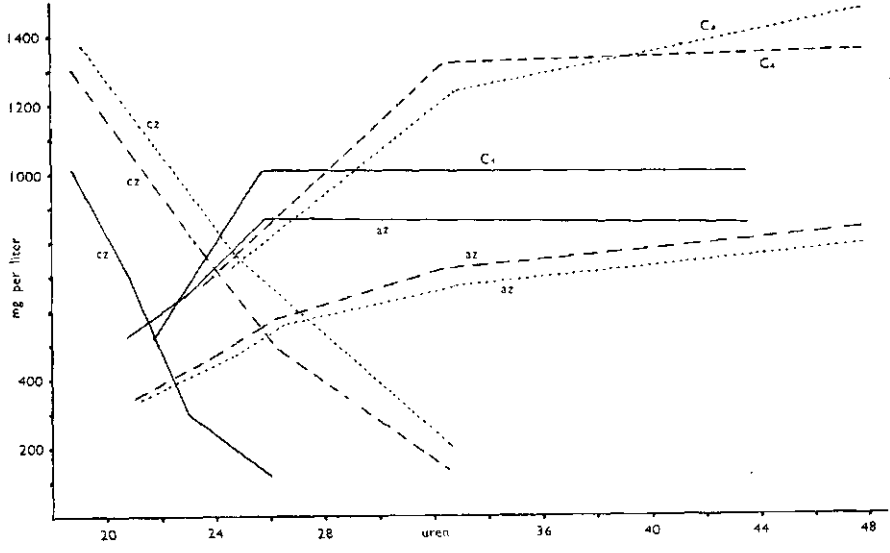


Fig. 11

Citroenzuurontleding en vorming van azijnzuur en C_4-producten in culturen, geënt met eenzelfde hoeveelheid van een melkzuurbacteriënstam en

——————— 1 % van de aromabetacoccus *a* 1,
- - - - - - - - - - - - - - - 1 % „ „ „ *d*,
. . . . . 0,05 % „ „ „ *d*.

De cijfers der C_4-producten zijn vermenigvuldigd met 5

Daar de beide stammen *a* 1 en *d* reeds lang bij ons in reincultuur in melk aanwezig waren, moeten wij dus concludeeren, dat bij het aanhouden van aromabacteriënstammen in reincultuur in melk hun reductievermogen meer of minder verloren gaat. Ook bleek dit bij de aromabacteriën, geïsoleerd uit zuursel 51. Bij de proef van tabel 14, welke genomen werd op 1 Februari 1939, waren de gevonden reductiepercentages bij de verschillende enthoeveelheden resp. 29, 61 en 88 en toen dezelfde proef herhaald werd op 21 Februari,

waarbij dus opnieuw samengesteld werd uit reincultures, die inmiddels 3 weken in reincultuur in melk aangehouden waren, was er slechts weinig reductie meer en variëerden de reductiepercentages slechts tusschen 22 en 28.

We kunnen uit het in dit hoofdstuk besprokene concludeeren, dat het bij practijkzuursels gevonden feit, dat een groote citroenzuurontledingssnelheid samengaat met een sterke reductie, ook aan reinculturen gedemonstreerd kan worden. Bij de reinculturen is het reductievermogen echter veel geringer dan dat van de aromabacteriën in practijkzuursels, waardoor bij de eerste de reductie bij eenzelfde citroenzuuromzettingssnelheid veel geringer is.

6. Verband tusschen citroenzuuromzetting en reductie bij practijkzuursels

Bij de derde groep onderzochte practijkzuursels werden weer dergelijke bepalingen gedaan als bij de tweede groep. Nadat in de met het zuursel geënte centrifugemelk het citroenzuur verdwenen was, werden de gehalten aan azijnzuur en C_4-producten bepaald en het reductiepercentage berekend.

Een aantal der ontvangen zuursels werd alle dagen met 0,1 % overgeënt in gepasteuriseerde centrifugemelk en na een week werden deze zuursels nogmaals voor een proef gebezigd.

Verder werd door bepalingen van het citroenzuurgehalte tijdens de zuring een beeld verkregen van de citroenzuuromzettingssnelheid. Het gaf zekere moeilijkheden om deze in een cijfer uit te drukken, omdat de snelheid der citroenzuurontleding niet constant is gedurende het zuringsproces. In het begin is zij slechts gering en aan het einde der zuring wordt zij ook weer kleiner wegens de hindering door den hoogen zuurgraad, welke inmiddels door de melkzuurstreptococcen veroorzaakt is. Wij vonden dat de citroenzuuromzettingssnelheid bij zuursels het grootst is als de zurende cultuur een titer heeft in de omgeving van 80 ml n/10 per 100 g. Op dit punt werd een citroenzuurbepaling gedaan en 8 uren later werd een tweede bepaling verricht. De hoeveelheid citroenzuur, welke in dezen tijd van 8 uren werd ontleed (eventueel berekend door rechtlijnige intra- of extrapolatie als het tijdsverschil niet precies 8 uren was), gaf ons een getal, dat eenigen indruk van de snelheid van citroenzuurontleding verschafte. De analyse na een week staan, zooals bij de 2de reeks, werd niet uitgevoerd, omdat bij de vorige serie het verband tusschen deze 2 analyses genoegzaam in het licht gesteld was. Een onderzoek naar het verloop der gisting bij een enting van 2 % werd ook niet meer gedaan.

De resultaten van het onderzoek zijn vereenigd in tabel 17.

TABEL 17

Zuursel	Oorspronkelijk zuursel					Entingspercentage	Kreat				
	Titer per 100 g	Kreatinereactie		citroenzuur	% aromabacteriën		24 u.	40 u.	48 u.	64 u.	88
		aank.	na 24 uur								
48	122,0	++		—	10	0,05	+++++	++++	++++	+++	++(
						0,02	—	+	+	—	
49	112,8	—		—	4	0,02	—	+	+	+(+)	+
						0,02	—	—	(+)	+(+)	
50	116,0	—		—	8	0,02	(+)	—	—		
						0,02	++	++(+)	—	—	
51	109,6	—		—	16	0,02	+(+)	+(+)	—		
						0,02	+(+)	—			
52	110,4	—		—	10	0,02	+(+)	—	—		
						0,02	+(+)	+++	(+)	—	
53	110,8	(+)	—	—	18	0,02	+	(+)	—	—	
54	114,0	(+)	—	—	14	0,02	—	+	+	—	—
55					4	0,02	+	+		—	
						0,01	—	+(+)	++(+)	+(+)	+
56					4	0,01	—	++	++(+)	++	+
57		—			16	0,01	—	+(+)	—		
58		—			26	0,01	—	(+)	(+)	—	
59		—				0,01	—	++++			++
60		+(+)	++++			0,01	+(+)	+++++	+++++	+++	
61		—				0,01			++(+)	(+)	
62		—				0,01		+			
63		++	±			0,01		++		(+)	
64		—	—			0,01	±	—			
65		+	—			0,01		(+)		±	
M 1						0,02	—	++(+)	++(+)	+++(+)	
M 1						0,02	+(+)	+++(+)	++++	++++(+)	

OPMERKING:

De tweede bepalingsreeks bij een zuursel heeft betrekking op een herhaling der analyse na 1 week dagelijks overenten.

ıcties na					mg citroenzuur per l			mg per l				R
12 u.	136 u.	160 u.	184 u.	208 u.	bij titer 80	8 uur later	ontledings-snelheid	azijnzuur	acetylmethylcarbinol	butyleenglycol	totaal C_4-producten	
+(+)	+	+			1541	414	1127	888	162	124	290	43
—					774	132	622	921	86	135	223	61
(+)	—	—			1484	1018	466	881	159	101	263	38
+(+)	++	++	++	+(+)	1710	1621	89	938	226	121	352	34
					1548	364	1148	941	0	230	230	100
					1575	439	1136	991	40	214	255	84
					1078	0	> 1078	957	34	199	234	85
					808	0	> 808	923	64	112	177	64
					1002	0	> 1002	928	52	150	203	74
					1289	402	887	888	66	174	241	73
					938	0	> 938	899	37	139	177	79
					995	118	877	888	76	99	177	57
					1493	1028	465	862	119	105	227	47
—					1430	940	490	897	160	179	343	53
+(+)	++	+(+)	+		1355	1055	300	842	215	84	304	28
					1034	101	933	904	95	171	268	64
					1185	247	938	901	61	171	234	74
+++	++++	++++			1566	1303	263	818	201	118	324	36
+++	+(+)	+(+)			1423	223	1200	882	180	102	286	36
—					1328	655	673	783	107	98	207	48
(+)					1121	665	456	874	132	72	207	35
—					1443	557	886	827	165	28	197	14
					1143	91	1052	909	0	138	138	100
—		—			1273	221	1052	888	93	95	190	50
+++(+)	+++(+)	+++(+)	+++		1709	1125	584	793	302	34	343	10
					1272	478	794	814	281	15	302	5

De gegevens over de ontvangen zuursels en de uitslag der kreatinereacties, uitgevoerd in de culturen, bespreken wij niet nader. Zij spreken voor zichzelf.

Beschouwen we het rechter gedeelte van de tabel, dan kunnen wij thans hieruit de citroenzuurontleding en de productie aan C_4-stoffen, alsmede het reductiepercentage met elkaar in verband brengen. In fig. 12 is, evenals in fig. 9, zichtbaar, dat het reductiepercentage ook bij deze reeks zuursels grooter is, naarmate de hoeveelheid gevormde C_4-producten kleiner is. Hierbij moet echter zuursel 63 uitgeschakeld worden; het zal straks blijken waarom. De betrekking tusschen beide grootheden is in deze figuur minder duidelijk dan in fig. 9. De reden van de groote spreiding kan voor een deel aan dezelfde oorzaak worden toegeschreven als bij de bespreking van fig. 9.

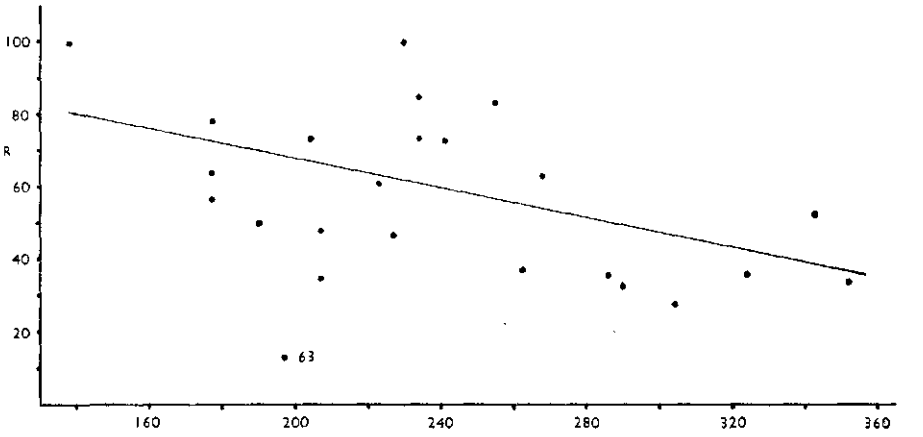


Fig. 12

Verband tusschen reductiepercentage R, bepaald na het verdwijnen van het citroenzuur, en de totale hoeveelheid C_4-producten bij de practijkzuursels 48—65
Regressielijn: $R = 108{,}9 - 0{,}201\ C_4$

Daar het citroenzuur, dat in de eerste phase van de zuring wordt omgezet, naar verhouding minder C_4-producten doet ontstaan dan het in de latere phase omgezette citroenzuur, hetwelk bij hoogeren zuurgraad ontleed wordt, moeten wij kunnen verwachten, dat de hoeveelheid ontstane C_4-producten, bepaald aan het einde van het citroenzuurontledingsproces, afhankelijk is van het meer of minder vroeg verdwijnen van het citroenzuur. Hoe eerder het citroenzuur geheel ontleed is, des te minder C_4-producten kunnen ontstaan. Een indruk van het meer of minder vroeg ontleden van het citroenzuur geeft ons de bepaling van het nog onontlede citroenzuur op een bepaald punt tijdens de zuring. Wij kozen hiervoor het punt, waarop de titer van de zurende cultuur tot 80 ml n/10 per 100 g is gestegen en in fig. 13 kan men zien, dat

de hoeveelheid C_4-stoffen, welke gevormd wordt, hooger is naarmate de citroenzuurconcentratie bij titer 80 hooger was, d.w.z. naarmate minder citroenzuur bij lageren zuurgraad werd omgezet. De spreiding in de figuur is vrij groot. Mogelijk wordt dit veroorzaakt doordat niet iedere aromabacteriënstam onder volkomen dezelfde omstandigheden dezelfde hoeveelheid C_4-stoffen produceert.

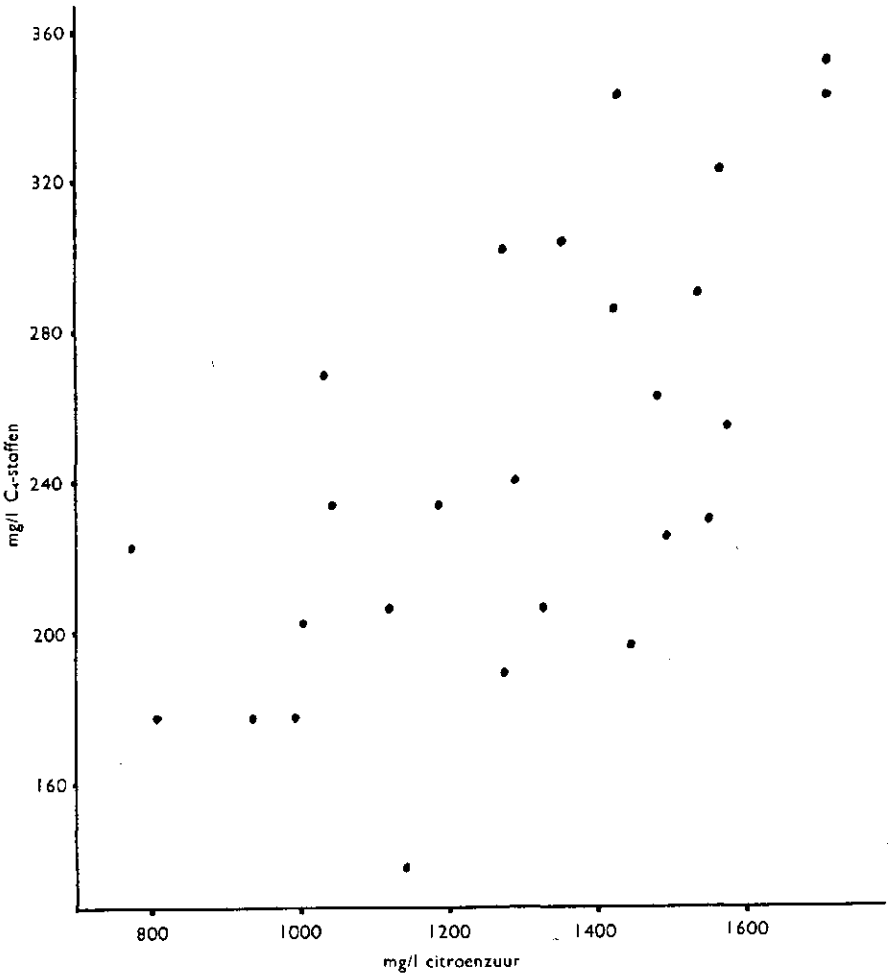


Fig. 13

Verband tusschen de totale hoeveelheid geproduceerde C_4-stoffen en het bij den zuurtiter 80 nog aanwezige citroenzuur bij de practijkzuursels 48—65

Als wij de productie van C_4-stoffen vergelijken met de citroenzuurconcentratie, 8 uur na het bereiken van den titer 80, dan zien wij hetzelfde resultaat, zij het dat de punten dan meer bij de citroenzuurconcentratie 0 worden opgehoopt (fig. 14).

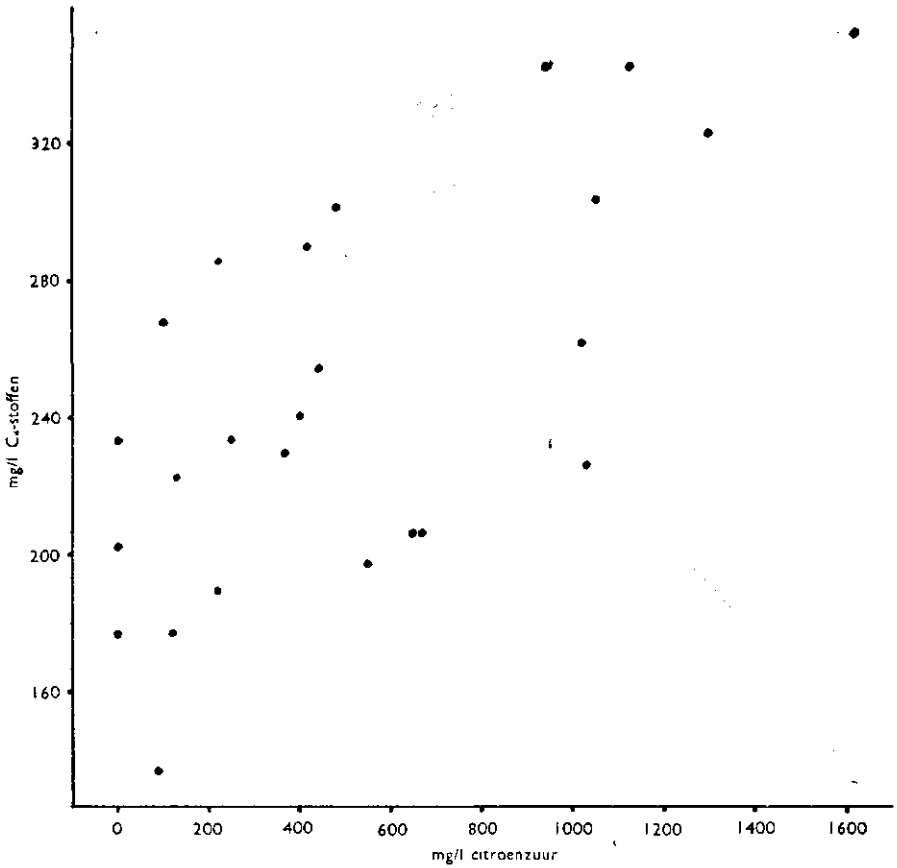


Fig. 14

Verband tusschen de totale hoeveelheid geproduceerde C_4-stoffen en de hoeveelheid citroenzuur, die nog aanwezig was 8 uren na het bereiken van den titer 80 bij de practijkzuursels 48—65

In fig. 15 zijn vergeleken de citroenzuuromzettingssnelheid met de reductie en wat in hoofdstuk B 4 afgeleid werd uit spaarzame gegevens, nl. dat bij een groote citroenzuurontledingssnelheid een hoog reductiepercentage behoort, vindt in deze figuur, waarin de cijfers voor deze grootheden direct vergeleken worden, zijn duidelijke bevestiging. Het verband is zelfs vrij nauw. Bij de

practijkzuursels vinden wij dus terug hetgeen wij in het vorige hoofdstuk aan de hand van proeven met reinculturen bewezen, nl. dat de activiteit der aromabacteriën het gedrag van een zuursel bepaalt. Uit fig. 15 meenen wij zelfs uit het nauwe verband te mogen concludeeren, dat het reductievermogen van de aromabacteriën der practijkzuursels vrijwel gelijk is, doch dat de ontplooide reductieactiviteit, zooals deze tot uiting komt in het reductiepercentage, verschillend is en samenhangt met de citroenzuuromzettingsactiviteit. Deze samenhang zou zijn theoretische verklaring kunnen vinden in de omstandigheid, dat de reductie nauw verband houdt met de suikerontleding. Zoowel citroenzuuromzetting als suikerafbraak zullen op gelijke wijze van de „activiteit" der aromabacteriën afhankelijk zijn.

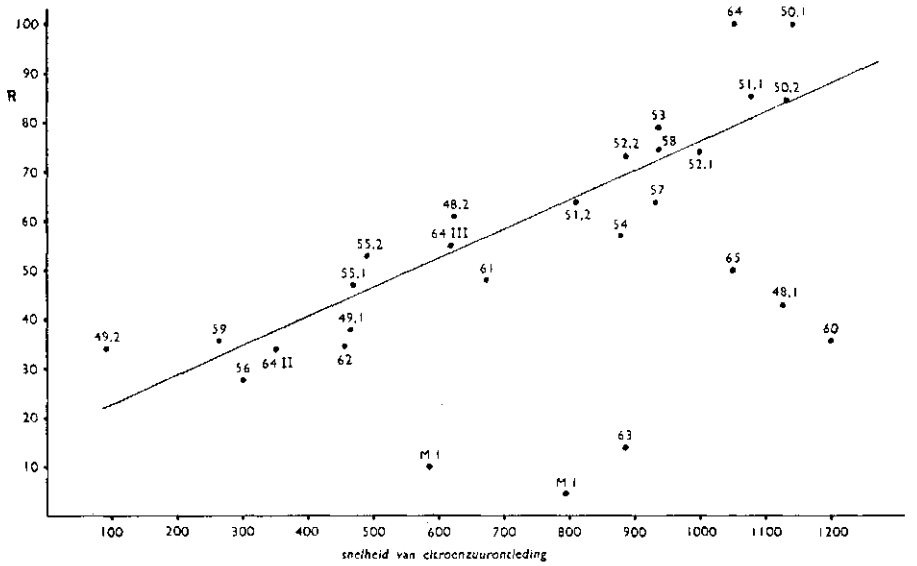


Fig. 15

Verband tusschen het reductiepercentage en de citroenzuurontledingssnelheid (mg in 8 uren) bij zuursels
Regressielijn: R = 17,0—0,06 V_{cz}.
Bij het berekenen der regressie zijn de zuursels M 1; 48,1; 60 en 63 niet in aanmerking genomen

In de figuur zien wij enkele uitzonderingen, nl. de 2 analyses van zuursel M 1 en de zuursels 60 en 63; 48,1 moeten wij waarschijnlijk beschouwen als een onjuiste bepaling van de citroenzuurontledingssnelheid en 65 neemt een tusschenpositie in. Het zuursel M 1 valt geheel buiten het gebied der practijkzuursels, omdat dit zuursel een laboratoriumzuursel is, hetwelk samengesteld

werd uit reinculturen van melkzuurstreptococcen en aromabetacoccen en wij in het vorige hoofdstuk hebben aangetoond, dat dergelijke aromabacteriën hun reductievermogen voor een groot deel hebben ingeboet. Ook bij hooge citroenzuuromzettingssnelheid kunnen deze aromabacteriën in zuursels dus maar weinig reductie vertoonen. Op grond hiervan meenen wij te moeten concludeeren, dat ook de uit de practijk ontvangen zuursels 60 en 63 zuursels zijn, welke oorspronkelijk uit reinculturen werden samengesteld.

7. Is de activiteit der aromabacteriën regelbaar?

In de vorige hoofdstukken kwamen wij tot het inzicht, dat het gedrag van de practijkzuursels geheel door de citroenzuuromzettingssnelheid bepaald wordt. De reductie hangt geheel met de snelheid van de citroenzuurontleding samen.

Uit fig. 15 blijkt, dat er bij de onderzochte zuursels groote verschillen in de citroenzuurontledingssnelheid werden gevonden, nl. van 100 tot 1200 mg citroenzuur per 8 uur. Ook zien we, dat deze snelheid bij eenzelfde zuursel niet constant is, zooals volgt uit de gegevens van die zuursels, waarbij een tweede bepaling een week later gedaan werd.

Dit doet de vraag rijzen, welke de reden zou kunnen zijn van de geobserveerde groote verschillen in citroenzuuromzettingssnelheid bij de onderzochte practijkzuursels. Wij zijn er nog niet in geslaagd voor het verschil in activiteit een verklaring te geven, doch mogen hieraan nog de volgende beschouwing vastknoopen.

Een snellere citroenzuuromzettingssnelheid kan veroorzaakt worden òf door sneller werkende aromabacteriën òf door een naar verhouding tot de melkzuurbacteriën grooter aantal aromabacteriën. Hoewel wij bij bacteriologische analyse van verschillende zuursels geen duidelijk verband vonden tusschen het reductievermogen (dus ook tusschen de citroenzuuromzettingssnelheid) en het percentage aromabacteriën in de flora, zagen wij toch in een aantal uiterste gevallen wel, dat bij een gering percentage aromabacteriën de citroenzuuraantasting langzaam verliep en de reductie gering was en dat bij een hoog percentage sterke reductie optrad. Hierin ligt een aanwijzing, dat het evenwicht tusschen melkzuur- en aromabacteriën de eigenschappen van het zuursel bepaalt. De verhouding tusschen deze twee bacteriesoorten zou mogelijk te wijzigen zijn door de overentingshoeveelheden te veranderen. Aromabetacoccen kunnen bij hoogere zuurgraden groeien dan melkzuurstreptococcen. Bijgevolg zal bij hoogeren zuurgraad in het zuursel de verhouding van aromabacteriën tot melkzuurbacteriën toenemen. Bij voortdurende overenting van een geheel uitgerijpt zuursel zal men dus het zuursel zóódanig

wijzigen, dat het naar verhouding steeds meer aromabacteriën zal bevatten; bij voortdurende overenting van een nog niet uitgerijpt zuursel, zal het percentage aromabacteriën in de flora steeds verminderen. D.w.z., dat in het eerste geval het zuursel steeds sterker zal reduceeren en in het tweede steeds minder.

TABEL 18

Zuursel alle dagen overgeent met verschillende enthoeveelheden . Kreatinereacties

Enting van	1 dag	2 dagen	3 dagen	4 dagen	5 dagen	6 dagen
	5 %					
14-3	+	+++	+++	++(+)		++(+)
15-3	+	+++	++(+)		+++	
20-3	+(+)	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)	
22-3	++	++	+(+)		—	—
26-3	+(+)	++	(+)	(+)	(+)	—
27-3	+++	—	—			
28-3						
29-3	++(+)	—	—			
1-4		+(+)	—	—		
3-4	++(+)	+	—			
	½ %					
14-3	—	+++	+++	++(+)		++
15-3	—	+++	+++		++(+)	
20-3	—	+(+)	+++	+++	+++(+)	
22-3	(+)	++(+)	++(+)		+	+
26-3	(+)	++	++	++(+)	+(+)	+(+)
27-3	++	++	+(+)	(+)	(+)	
28-3						
29-3						
1-4		++(+)	++(+)	+++	++(+)	
3-4	—	+++	++(+)			
	0,02 %					
14-3	—	+	+++	+++		+++
15-3	—	—	—		—	
20-3	—	—	—	—	—	
22-3	—	—	—		—	—
	vanaf 26—3 met 5 %					
27-3	—	—	—	—	—	
28-3	—	—	(+)	(+)		
29-3	(+)	+++(+)			+++(+)	+++(+)
1-4		++(+)		++(+)	+++	
3-4	+(+)	+++	++(+)			

Wij hebben dit toegepast op een zelf samengesteld zuursel, bereid door samenenting van melkzuurstreptococcen en aromabetacoccen, uit zuursel 53 geïsoleerd. Om overentingen te kunnen verrichten in verschillenden rijpheidstoestand werden verschillende entingspercentages toegepast, nl. 5 %, ½ % en 0,02 %. De toestand van deze 3 zuursels werd vervolgd door dagelijksche kreatinereacties. De proef werd begonnen op 13 Maart 1939. Zie tabel 18.

In deze tabel komt duidelijk de invloed, dien de overentingshoeveelheid op het gedrag van het zuursel heeft, tot uiting, alsmede de invloed van dezen factor op de reductie. Bij de 0,02 % enting werd reeds na 2 overentingen zoo'n langzame citroenzuurvergisting in de cultuur verkregen, dat in 5 dagen tijd geen C_4-stoffen aantoonbaar waren. Na 5 of 6 dagen was in deze culturen dan ook nog zeer veel citroenzuur aanwezig. Hoewel het er bij deze 0,02 % enting naar uitzag alsof de aromabacteriën zelfs geheel verdwenen waren, bleek dit niet het geval te zijn, want toen van 27 Maart af deze cultuur dagelijks met 5 % overgeënt werd, ontstonden hierin ook weldra weer C_4-stoffen. Men ziet, dat door deze entingsverandering het evenwicht zich snel verplaatste.

De ½ % enting hield zich goed constant, doch de 5 % enting ging in verloop van tijd steeds sneller haar C_4-stoffen produceeren en deze ook sneller tot butyleenglycol reduceeren.

Hierna hebben we deze proef ook toegepast op enkele practijkzuursels. Hier waren de resultaten niet zoo duidelijk. Bij sommige zuursels was wel iets te bemerken van den invloed, die de enthoeveelheid uitoefende, bij andere daarentegen niet. In het algemeen bleven ook in de geringe entingen de citroenzuuromzettingssnelheid en de reductie groot. Bij zuursel 64 is na 97 dagen regelmatig overenten met resp. 0,03 % (genoemd 64 II) en 2 % (genoemd 64 III) wederom een volledige analyse gemaakt, welke inderdaad verschil gaf. Bij 64 II werd toen bij een citroenzuurontledingssnelheid van 351 mg per 8 uur 34 % reductie gevonden en bij 64 III waren deze getallen 617 mg en 55 %. Deze 2 bepalingen zijn ook in fig. 15 opgenomen.

Het blijft echter duidelijk, dat de zuursels, welke samengesteld waren met reingekweekte aromabacteriënstammen gevoeliger zijn voor wijzigingen in de enthoeveelheid dan de practijkzuursels. Eerder zagen wij, dat door reincultiveering ook het reductievermogen verandert. Hieruit moge de gevolgtrekking worden gemaakt, dat reinkweeking of het bewaren van aromabacteriën in reincultuur enkele eigenschappen beïnvloedt, waardoor reingecultiveerde aromabacteriën zich van aromabacteriën in practijkzuursels onderscheiden. Door het bewaren in reincultuur behoeft evenwel het ontledingsvermogen voor citroenzuur niet geschaad te worden. Bij de proeven met het uit reinculturen samengestelde zuursel M 1 vonden wij voor de citroenzuuromzettingssnelheid een normale waarde van 600—800 mg in 8 uur; bij

een ander zelf samengesteld zuursel, waarvan de componenten afkomstig waren uit het zuursel 65, werd 750—1000 mg in 8 uren bij een reductiepercentage van resp. slechts 12 en 27 % gevonden.

Het zal uit deze overwegingen nu ook begrijpelijk zijn, dat wij bij de practijkzuursels nooit het in hoofdstuk B 1 genoemde geval *a* (citroenzuuromzetting normaal; geen reductie) aantroffen. Bij normale ontledingssnelheden was daar de reductie steeds hoog. Het geval *a* kan men slechts bij zuursels aantreffen, welke zijn samengesteld met behulp van reingekweekte aromabacteriën.

CONCLUSIES

Vatten wij samen welke practische resultaten ons onderzoek om te komen tot een meer rationeele onderzoekmethode voor zuursels heeft opgeleverd, dan meenen wij, dat wij in het vinden van deze methoden zeer zeker geslaagd zijn. De zuurvorming, welke snel dient te geschieden, kan op eenvoudige wijze beoordeeld worden door den tijd te meten, gedurende welken de titer van het zuursel van 40 tot 60 ml n/10 per 100 g zuursel stijgt. Zij is bij eenige ervaring dus te bepalen door een tweetal titraties. De door ons gegeven cijfers zijn echter slechts een maatstaf voor nauwkeurig bij 21° C genomen proeven. Bij andere temperaturen vindt men andere waarden.

Bij het onderzoek der practijkzuursels bleek, dat de zuringssnelheid in bijna alle gevallen voldoende was.

Wat de aromavorming der practijkzuursels betreft, vonden wij, dat in verreweg de meeste gevallen de geurstof diacetyl en het steeds als begeleidende stof aanwezige acetylmethylcarbinol, welke door de aromabacteriën uit het in de melk aanwezige citroenzuur gevormd worden, door deze worden gereduceerd tot het reukelooze butyleenglycol. Er bleek nu in practijkzuursels een duidelijk verband te bestaan tusschen de citroenzuuromzettingssnelheid en de reductie, in dien zin, dat een snelle citroenzuurontleding een sterke reductie meebrengt. Daar door een snelle citroenzuurontleding ook de productie van C_4-verbindingen (w.o. diacetyl) nadeelig beïnvloed wordt, is het zeer zeker gerechtvaardigd de gevolgtrekking te maken, dat in practijkzuursels de activiteit der aromabacteriën te groot is.

We zijn in staat de werkzaamheid der aromabacteriën na te gaan door de citroenzuuromzettingssnelheid en den reductiefactor R te bepalen, zooals dit in deze verhandeling is aangegeven. Men krijgt hierover echter ook een indruk door de kreatinereactie op een aantal verschillende tijdstippen uit te voeren en wij zijn dan ook van oordeel, dat de kreatinereactie, mede dank zij den eenvoudigen uitvoeringsvorm, voor het beoordeelen van de aromatische eigenschappen van een zuursel goede diensten kan bewijzen.

Wanneer deze reactie reeds spoedig sterk positief wordt en ook later sterk positief blijft, dan is het zuursel goed. Wanneer de reactie slechts zwak positief wordt en later snel negatief, dan heeft het zuursel geen goede aromatische eigenschappen. Zooals reeds opgemerkt is, was dit laatste bij zeer veel zuursels het geval.

Onze proeven wijzen tevens den weg aan waarlangs deze, naar onze meening te verwerpen eigenschap van zuursels zou kunnen worden voorkomen. Een zekeren invloed op het evenwicht tusschen aromabacteriën en melkzuurbacteriën oefent men uit door de grootte der dagelijksche overenting. Het is zeer wel mogelijk door een kleiner entpercentage de activiteit der aromabacteriën te verminderen, waardoor een zuursel met betere aromatische eigenschappen ontstaat.

In de tweede plaats verliezen de aromabacteriën door reincultiveeren een groot deel van hun reductievermogen. Het vermogen tot snelle ontleding van citroenzuur ondergaat daarbij minder schade, zoodat het vermoeden gewettigd is, dat met behulp van aromabacteriën met een gering reductievermogen en een behoorlijke citroenzuuromzettingssnelheid zuursels met krachtige aromavorming kunnen worden samengesteld. Op deze wijze kan door een rationeele zuurselsamenstelling een schrede voorwaarts gezet worden naar ons eigenlijke doel: de regeling van het aroma bij de boterbereiding.

OVERZICHT

Voor de kwaliteit van zuursels zijn van belang de snelheid, waarmede de melkzuurvorming plaats grijpt, en de aromavorming.

De zuurvorming dient uit practische overwegingen snel te geschieden. Het is echter niet eenvoudig om deze snelheid in een maat uit te drukken, omdat de hoeveelheid zuur, welke zich in de tijdseenheid vormt, niet constant blijft gedurende de zuring (fig. 1). De methode, waarbij het zuursel op weigelatine uitgezaaid wordt en van de afgeënte koloniën bepaald wordt in hoeveel tijd zij melk tot zuurstremming brengen, bleek niet bruikbaar te zijn. Daar in de zuringskromme het stuk tusschen de titers 40 en 60 ml n/10 per 100 g zuursel vrijwel door een rechte lijn wordt voorgesteld (zie fig. 2 en 3) en bij dit zuurgraadsinterval in het algemeen de titercijfers nog niet gecompliceerd worden door in het zuursel ontstaan koolzuur, bepaalden wij de zuringssnelheid door den tijd te meten, welke noodig was om dit traject te doorloopen (fig. 4).

Wij vonden bij een groot aantal practijkzuursels, welke op deze wijze bij een constante temperatuur van 21,0° C onderzocht werden, weinig verschillen. Slechts zelden was de zuringssnelheid langzamer dan het gemiddelde.

Op theoretische gronden verwachtten wij, wat de aromavorming betreft, de volgende mogelijkheden:

a. Citroenzuurontleding normaal; veel C_4-stoffen; geringe reductie van acetylmethylcarbinol en diacetyl tot het reukelooze butyleenglycol.

b. Citroenzuurontleding normaal; veel C_4-stoffen; sterke reductie.

c. Te vroege citroenzuurontleding; weinig C_4-stoffen; sterke reductie.

d. Te late citroenzuurontleding; veel C_4-stoffen; geringe reductie.

e. Geen citroenzuurontleding, omdat aromabacteriën ontbreken; geen C_4-stoffen.

Bij de onderzochte zuursels kwam het geval *e* nooit voor; *b*, *c* en *d* werden wel aangetroffen, doch meestal kwam geval *b* voor (zie b.v. tabel 2) en dit beschouwen wij als een nadeel, omdat hierdoor de geurstoffen verdwijnen.

De reductie tot butyleenglycol speelt dus blijkbaar een groote rol en is daarom nader bestudeerd. Daar zij ook geschiedt in vloeistoffen, waaraan acetylmethylcarbinol is toegevoegd en waarin citroenzuur ontbreekt, en in melk nog voortduurt, lang nadat het citroenzuur volledig is omgezet, moet de waterstof voor deze reductie geleverd worden door een stof, staande buiten de citroenzuurstofwisseling; waarschijnlijk wordt deze waterstof geleverd door een tusschenstof der suikerstofwisseling. Het azijnzuurgehalte wordt bij de reductie hooger.

De meerdere of mindere reductie kan uitgedrukt worden in het **reductiepercentage R,** d.i. het percentage C_4-producten, dat in den vorm van butyleenglycol voorkomt. In zuursels en in reinculturen van aromabacteriën in zuurgemaakte melk stijgt dit percentage met den tijd.

Verschillende stammen van aromabacteriënreinculturen hebben een verschillend reductievermogen. Toch gelukte het niet met deze een reduceerend zuursel samen te stellen. Blijkbaar verliezen zij bij bewaring in reincultuur te veel van hun reductievermogen. Er kon dan ook geen verband worden geconstateerd tusschen de sterkte van de reductie in een zuursel en het reductievermogen van uit het zuursel gekweekte aromabacteriën.

Bij een aantal zuursels werd het reductiepercentage R bepaald, eerst op een oogenblik, dat het citroenzuur pas volledig ontleed was, en dan een week later (tabel 9). In het algemeen waren de getallen hoog en tusschen de cijfers der 1ste en 2de bepaling bestond een duidelijk verband (fig. 8), d.w.z., dat bij een zuursel de reductieneiging reeds tijdens de citroenzuurvergisting kan worden bepaald. De reductie vindt reeds tijdens de citroenzuurvergisting plaats.

Uit het verband, dat bleek te bestaan tusschen het reductiepercentage en de totale hoeveelheid geproduceerde C_4-stoffen, konden wij afleiden, dat waarschijnlijk de reductiegraad niet bepaald wordt door verschil in reductievermogen der aanwezige aromabacteriën, maar door de snelheid, waarmede het citroenzuur wordt ontleed. Hoe grooter deze is, des te sterker is de reductie. Hieruit blijkt, dat er tusschen de 2 naast elkaar verloopende processen van citroenzuurontleding en reductie eenig verband moet bestaan. Het is waarschijnlijk, dat de suikerafbraak, welke de reductie teweeg brengt, en de citroenzuurafbraak beide afhangen van de „activiteit" der bacteriën. De activiteit toch zal beide processen moeten beheerschen. Inderdaad blijkt bij proeven met reinculturen, dat naarmate het citroenzuur eerder ontleed is, de reductie sterker is (tabellen 13 en 14). Bij gebruik van niet-reduceerende aromabacteriën wordt dit niet gevonden, daar dan ook zelfs in het voor reductie allergunstigste geval bijna geen reductie optreedt. Uit de analyses volgde, dat, overeenkomstig onze vroegere onderzoekingen, de vorming van C_4-stoffen en van het grootste deel van het azijnzuur beëindigd is als het citroenzuur is omgezet (zie fig. 10 en 11, alsook fig. 7).

Ook bij de practijkzuursels bestond duidelijk verband tusschen de citroenzuuromzettingssnelheid en den reductiegraad alsmede tusschen dezen laatste en de totale hoeveelheid C_4-stoffen (zie tabel 17 en de figuren 12 en 15). Het verband tusschen citroenzuurontledingssnelheid en reductiegraad was zelfs zóó eng, dat wij niet aarzelen om den reductiegraad als vrijwel evenredig met de citroenzuuromzettingssnelheid te beschouwen.

Slechts zuursels, welke zijn samengesteld met gebruikmaking van reincultuurstammen van aromabacteriën, vormden hierop een uitzondering. Deze reincultuurstammen hebben hun reductievermogen voor het grootste deel verloren en veroorzaken dus in zuursels ook bij hooge citroenzuuromzettingssnelheden slechts weinig reductie (geval *a*). In deze zuursels vindt dus eigenlijk de beste aromavorming plaats.

De eigenschappen van een zuursel zijn niet constant. Zuursels b.v. waarbij 2 analyses werden verricht (de 2de keer na eenigen tijd van dag tot dag overgeënt te zijn), kwamen in de grafische voorstelling (fig. 15) in 2 verschillende punten te liggen. Het is mogelijk, dat dit verband houdt met het overentingspercentage, waar b.v. bij zware overenting het aandeel der aromabacteriën in de flora grooter worden kan. Bij zuursels, samengesteld uit reinculturen, konden wij door verschil in overentingshoeveelheid het karakter van het zuursel wijzigen (tabel 18), doch bij practijkzuursels, waarin de aromabacteriën minder gevoelig zijn, gelukte dit niet zoo duidelijk.

ZUSAMMENFASSUNG

UNTERSUCHUNGEN ÜBER SÄUERUNG UND AROMABILDUNG IN SÄUREWECKERN

Der Verlauf der Säuerung und der Aromabildung ist für die Qualität eines Säureweckers von groszer Bedeutung. Aus praktischen Gründen soll die Säurebildung möglichst schnell geschehen. Es ist aber nicht einfach, die Geschwindigkeit der Säuerung zahlenmäszig zum Ausdruck zu bringen, weil die sich in einer bestimmten Zeiteinheit bildende Säuremenge nicht konstant ist.

Wir prüften deshalb ein Verfahren nach, wobei nach Verimpfung des Säureweckers auf Molkengelatine eine Anzahl Kolonien in sterile Magermilch abgestochen wurde und von jeder dieser Kulturen die Gerinnungszeit bestimmt wurde. Wir hofften, dasz die Anzahl innerhalb 2 Tagen gerinnenden Kulturen ein Masz für die Säuerungsgeschwindigkeit des Säureweckers sein würde. Dieses war aber keineswegs der Fall. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse dieser Methode bei einer Anzahl kräftig säuerenden Säurewecker vereinigt und es ist leicht ersichtlich, dasz es grosze Unterschiede gibt. Auch erfuhren wir, dasz bei Weiterimpfen der Kulturen Schwankungen in der Gerinnungszeit auftreten. Die Gerinnungszeit ist somit keine konstante Eigenschaft der isolierten Kulturen und deshalb ist dieses Verfahren denn auch völlig unbrauchbar.

Der Verlauf der Säurebildung wird bekanntlich vorgestellt wie in Fig. 1. Wenn wir diese Figur betrachten dann sehen wir, dasz die Kurve zwischen 40 und 60 m n/10 pro 100 g Säurewecker fast geradlinig ist. Dasz dieses nicht nur theoretisch der Fall ist, beweisen die Figuren 2 und 3, in welchen einige praktisch bestimmten Titrationskurven dargestellt sind. Auch werden in dieser Strecke die Zahlen nicht nennenswert beeinfluszt durch die später im Säurewecker entstehende Kohlensäure. Die Möglichkeit einer Geschwindigkeitsbestimmung in dieser Strecke war also gegeben und wurde ausgeführt durch Messung des Zeitverlaufes während dieses Intervalles auf eine Weise wie Fig. 4 veranschaulicht. Es zeigte sich dabei, dasz bei genauer Innehaltung der Temperatur die Reproduzierbarkeit der gefundenen Zahlen befriedigend war.

Die Methode wurde angewandt bei vielen Säureweckern der Praxis. Der gefundene Durchschnittswert bei 21,0° C betrug 2,0 bis 2,3 Stunden. Nur in wenigen Fällen war der Verlauf der Säuerung etwas langsamer. Das Säurebildungsvermögen der untersuchten Säurewecker der Praxis war also durchaus günstig zu nennen.

Theoretische Erwägungen auf Grund unseres früheren theoretischen Studiums der Aromabildung (1) gaben uns Anlasz nachstehende Möglichkeiten bei Säureweckern der Praxis zu erwarten:

a. Vergärung der Citronensäure normal; starke Bildung von C_4-Verbindungen; schwache Reduktion von Acetoin und Diacetyl zu Butylenglykol.

b. Vergärung der Citronensäure normal; starke Bildung von C_4-Verbindungen; kräftige Reduktion.

c. Vergärung der Citronensäure zu früh; geringe Bildung von C_4-Verbindungen; kräftige Reduktion.

d. Vergärung der Citronensäure zu spät; starke Bildung von C_4-Verbindungen; schwache Reduktion.

e. Keine Vergärung der Citronensäure, weil Aromabakterien fehlen; keine Bildung von C_4-Verbindungen.

Die Untersuchung einer groszen Anzahl Säurewecker der Praxis ergab aber 1. dasz Aromabakterien niemals fehlten; 2. dasz, wenn auch die anderen Fälle ab und zu vorkamen, Fall b weitaus am meisten verbreitet war. Nach unserer Meinung ist das als einen Nachteil dieser Säurewecker aufzufassen, weil durch eine kräftige Reduktion das gebildete Aroma schnell verschwindet.

Wir haben deshalb die Reduktionserscheinung in Säureweckern näher studiert.

In erster Linie stellten wir fest, dasz die Reduktion von zugesetztem Acetoin auch stattfindet in citronensäurefreien Nährlösungen, sowie in Milch, lange nachdem die Citronensäure vollständig zersetzt worden war (Tabellen 3 und 4, Fig. 5). Es ist deshalb auszuschlieszen, dasz die für die Reduktion benötigte Menge Wasserstoff von der Citronensäure oder einem Zwischenprodukte der Citronensäuredissimilation herstammt. Wahrscheinlich wird dieser Wasserstoff von einem Zwischenprodukte des Zuckerabbauprozesses geliefert. Wir konnten nebenbei feststellen, dasz der Gehalt an Essigsäure während der Reduktion ein wenig ansteigt.

In unserer Abhandlung gibt die Zahl R den Reduktionsgrad an. Sie bedeutet die Prozentzahl der gesamten C_4-Verbindungen, welche in der Form von 2—3 Butylenglykol vorhanden ist. In Säureweckern, sowie in Reinkulturen von Aromabakterien in angesäuerter Milch, wächst die Zahl R im Laufe der Zeit stetig an. Auch kann man mit Hilfe der sogenannten Kreatinprobe (4) den Verlauf der Reduktion ganz bequem verfolgen.

Auf diese Weise stellten wir fest, dasz die reinkultivierte Aromabakterienstämme ein mehr oder wenig stark reduzierendes Vermögen besitzen (Tabelle 8). Es gelang aber nicht mit diesen Stämmen einen kräftig reduzierenden Säurewecker zusammenzustellen. Offenbar verlieren die Stämme während ihrer Reinkultivierung oder ihrer Weiterimpfung ihr Reduktionsvermögen zum gröszten Teil. Ein Zusammenhang zwischen der Reduktionskraft in einem Säurewecker und dem Reduktionsvermögen der daraus isolierten Aromabakterien war denn auch nicht vorhanden.

In einer Anzahl Säurewecker bestimmten wir den Reduktionsfaktor R zweimal und zwar zum ersten Male sofort nachdem die Citronensäure völlig vergoren war und zum zweiten Male eine Woche später (Tabellen 9 und 11). Im allgemeinen waren die Zahlen hoch, wie wir schon betont haben. Zwischen den Ziffern der ersten und der zweiten Bestimmung besteht ein deutlicher Zusammenhang wie in Fig. 8 gezeichnet ist. Das heiszt also, dasz bei einem Säurewecker die Reduktionskraft schon während der Citronensäurevergärung bestimmt werden kann. Die Reduktion findet somit zum Teil schon während des Citronensäureabbaues statt.

Auffällig war es, dasz zwischen dem Reduktionsfaktor R und der Gesamtmenge der gebildeten C_4-Verbindungen eine gewisse Korrelation bestand (Tabelle 11, Fig. 9). Hieraus kann man schlieszen, dasz der Reduktionsgrad nicht vom Reduktionsvermögen der Aromabakterien abhängt, aber nur von der Geschwindigkeit der Citronensäurevergärung, weil bei einem schnellem Abbau der Citronensäure weniger C_4-Stoffe entstehen wie bei einem langsameren. Diese Feststellung läszt sich nur erklären, wenn man annimmt, dasz indem die Reduktion abhängig ist von der Zuckervergärung und die Bildung von C_4-Verbindungen von der Citronensäurevergärung, die Geschwindigkeit der beiden Prozesse mit der „Aktivität" der Aromabakterien verknüpft ist. Deshalb musz ein gewisser Zusammenhang zwischen beiden Prozessen bestehen. In der Tat konnten wir bei unseren Versuchen mit Reinkulturen von Aromabakterien und Milchsäurebakterien feststellen, dasz je früher die Citronensäure völlig zersetzt worden war, desto gröszer auch der Reduktionsgrad war (Tabellen 13 und 14, Fig. 10). Es war allerdings nötig hierbei die kräftigst reduzierenden Aromabakterien zu gebrauchen, denn sonst war, eben unter den günstigsten Verhältnissen, fast keine Reduktion festzustellen.

Aus unseren Analysendaten geht weiter in schöner Übereinstimmung mit den in einer vorigen Abhandlung mitgeteilten Ergebnissen hervor, dasz die Bildung der C_4-Verbindungen, sowie des gröszten Teiles der Essigsäure beëndet ist im Momente, dasz die Citronensäure völlig zersetzt ist (Figuren 7, 10 und 11).

Auch bei den Säureweckern der Praxis war ein deutlicher Zusammenhang zwischen R und Citronensäureabbaugeschwindigkeit vorhanden [1]) (Tabelle 17, Fig. 15). Letzterer war so stark ausgeprägt, dasz der Reduktionsgrad als proportional mit der Citronensäureabbaugeschwindigkeit anzusehen ist.

Wir müszen aber ausdrücklich betonen, dasz dieses nur bei Säureweckern der Praxis Stich hält, denn bei mit Reinkulturen zusammengestellten Säureweckern haben die Aromabakterien, wie erwähnt, ihr Reduktionsvermögen bei der Isolierung zum gröszten Teil verloren. Auch bei einer schnellen Citronensäurevergärung gibt es bei diesen nur eine schwache Reduktion (M1). In Bezug auf die Aromabildung erscheint uns dieses als vorteilhaft.

Wir sind leider nicht imstande den Unterschied zwischen den verschiedenen Säureweckern der Praxis völlig zu erklären. Wir wollen aber die Aufmerksamkeit lenken auf die Tatsache, dasz bei zweimaliger Bestimmung desselben Säureweckers (das zweite Mal nach täglichem Überpflanzen während einiger Zeit) die Stellung des Säureweckers in Fig. 15 nie dieselbe ist. Wie wir sehen tritt jedesmal eine Verschiebung auf, die oft zu grosz ist um sie auf Ungenauigkeiten bei der Bestimmung zurückzuführen.

Es ist nun möglich, dasz diese Erscheinung mit der Grösze der Impfmenge zusammenhängt, denn wir wissen, dasz bei stärkerer täglicher Impfung die Anzahl der Aromabakterien im Säurewecker verhältnismäszig gröszer werden kann. In der Tat gelang es uns bei selbst zusammengestellten Mischkulturen durch Impfungsunterschiede den Karakter des Säureweckers beliebig zu ändern (Tabelle 18). Bei Säureweckern der Praxis, worin die Aromabakterien weniger empfindlich sind, war das Resultat nicht so deutlich.

Schlieszlich wollen wir noch bemerken, dasz die häufig in Säureweckern der Praxis vorkommenden starken Reduktionserscheinungen nachteilig für die Aromabildung auswirken müszen. Diese zu vermeiden ist sehr erwünscht.

Für die ungefähre Bestimmung der Reduktionsgeschwindigkeit kann die Kreatinprobe, an mehreren Tagen hintereinander ausgeführt, gute Dienste leisten.

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON SOURING AND AROMA FORMATION IN BUTTER STARTERS

The quality of a butter culture (starter) depends mainly on the rapidity of acid formation and the intensity of aroma formation.

[1]) Zur Feststellung dieser Geschwindigkeit wurde die Menge Citronensäure bestimmt, welche seit dem Erreichen einer Säuregrad von 80 ml n/10 pro 100 g innerhalb 8 Stunden vergoren wurde. In dieser Strecke ist die Abbaugeschwindigkeit am gröszten.

For practical reasons the formation of acid must be rapid. It is however not easy to express this rapidity in figures, because the rate of acid formation varies considerably during the souring of the culture. As is generally known the acid-time curve can be represented as in Fig. 1.

At first we therefore tried to get an idea of the rapidity of a starter by picking off colonies from a culture on whey-gelatine into milk tubes and destinating the time in days, required for coagulation. We thought that the number of cultures coagulating within two days, might give us an insight in the rapidity of the starter itself, but it soon became clear that the variation in coagulation time was very widespread and that the number of rapidly coagulating cultures did not correspond with the rapidity of acid formation of the starters. Table 1 in which the result of this method with a number of rapidly acidifying starters is registrated shows this clearly. Moreover it was soon stated that the coagulation time of the isolated cultures was not constant at all. So this method was abandoned.

Considering Fig. 1 we realised that between the acidities of 40 and 60 ml n/10 per 100 gram starter the curve is practically a straight line and that in this interval the titration figures are not yet complicated by carbonic acid which develops later in starter cultures. That this is really so could be demonstrated with a great number of starters. In Fig. 2 and 3 some examples are given and Fig. 4 illustrates how the time, required to run through this interval, can be graphically measured.

The reliability of this method proved to be satisfactory if the temperature carefully was kept constant by incubating in a waterbath.

In applying this method at a temperature of 21,0° C to starters of the practice we found that most of them required 2,0 to 2,3 hours to bring the acidity from 40 to 60 ml n/10 per 100 gram. With few of them the acid formation was a little bit slower.

We conclude therefore, that the rapidity of acid formation in starter cultures is practically always sufficient.

According to our theoretical views concerning aroma formation outlined in a previous paper (1) we thought that in starter cultures the following possibilities might be expected.

a. Citric acid fermentation normal; high production of C_4-compounds; slight reduction of acetoin and diacetyl to butylene glycol.

b. Citric acid fermentation normal; high production of C_4-compounds; strong reduction.

c. Citric acid fermentation too soon; low production of C_4-compounds; strong reduction.

d. Citric acid fermentation too late; high production of C_4-compounds; slight reduction.

e. No citric acid fermentation because of a lack of aromabetacocci; no C_4-compounds.

In this recapitulation case *a.* is the prefered one. In our investigation of 65 starters of the practice however we found this case only by exception. The same can be said of the cases *c.* and *d.*, while case *e.* never was observed. The majority of the starters showed a behaviour as mentioned under *b.* and we consider this as disadvantageous, because in this case the aromatic odour soon disappears as a result of the strong reduction.

The reduction to butylene glycol apparently is of great importance in starters and therefore this point was studied more in detail.

At first we demonstrated that this reduction of acetoin also occurs in a citric acid free medium and that in milk, long after complete decomposition of the citric acid, the reduction of the C_4-compounds continues (tables 3 and 4, Fig. 5). So we conclude that the hydrogen, which is necessary for the reduction, is not furnished by the citric acid fermentation process or its intermediate products but by an intermediate substance of the sugar dissimilation. This conclusion is fully in accordance with the results, described in our previous paper (1). We noted that acetic acid is formed in small quantities during this reduction.

More or less reduction can be expressed by a figure R, which indicates the percentage of the total amount of C_4-compounds, present in the form of butylene glycol. In starters as well as in pure cultures of aromabetacocci in acidified milk this percentage increases in the course of time.

An insight in the rate of reduction can also be obtained by applying HAMMER'S "creatine test" on subsequent days.

With regard to pure cultures of aromabetacocci we observed differences in the reduction capacity (table 8), but no means this reduction was as strong as in starters. Consequently a correlation between the reducing capacity of a starter and of the strains of aromabetacocci isolated from it could not be found. We failed also to compose a strongly reducing starter from pure strains of aromabetacocci with lactic acid streptococci. The conclusion must be drawn that the procedure of pure culture and keeping in a pure culture state of the aromabetacocci highly diminishes their reducing power.

With a number of starters of the practice we determined the figure R twice, at first when all citric acid had just been fermented and the second time a week later (see table 11). Generally the percentages were high and between the figures of the first and second determination a close relation

could be observed (Fig. 8). This means that in a starter the tendency to reduction can already be determined, when the citric acid fermentation is still in progress. Citric acid fermentation and reduction are both accomplished by the aromabetacocci. Reduction takes place during the citric acid fermentation and afterwards.

We found a relation between R and the total amount of C_4-products (table 11, fig. 9). As a low production of C_4-compounds means a more rapid decomposition of citric acid (1), we must conclude that both reduction and rapidity of citric acid fermentation are dependent on the same governing factor. Probably this factor is the "activity" of aromabetacocci, because the activity influences the intensity of the sugar fermentation process (which is related with the reduction) as well as that of the citric acid fermentation.

As a matter of fact we could prove with pure cultures that the reduction is stronger, when citric acid has earlier been fermented (tables 13 and 14, Fig. 10). Using slightly reducing aromabetacocci we were not able to show this, because even under the most favorable conditions reduction hardly took place.

In accordance with our previously described experiments, the analyses show that the formation of C_4-compounds and of the greatest part of acetic acid is accomplished at the time all citric acid has been fermented (see Fig. 10 and 11, as well as Fig. 7).

Concerning starters of the practice it can be said that the relation between reduction and total amount of C_4-compounds and between the rapidity of citric acid fermentation and reduction is clearly visible from table 17 and Fig. 12 and 15[1]). The latter was even so close that we do not hesitate to consider the rapidity of citric acid fermentation as a measure for the rate of reduction.

This holds true only for starters of the practice and not for starters composed by mixing pure cultures of aromabetacocci and lactic acid bacteria, because pure cultures of aromabetacocci have lost their reducing power as said above. In starters composed of pure cultures (e. g. Mi) the reduction is always slight even when the rapidity of citric acid fermentation is high and therefore we must consider them as the best ones from a point of view of the formation of aroma.

The difference in behaviour between the various starters of the practice could not fully be understood. But attention must be drawn to the fact

---

[1]) The rapidity of the citric acid fermentation was calculated as the difference of 2 determinations of the citric acid content, the first when the starter culture had reached the acidity of 80 ml n/10 per 100 g and the second 8 hours later. In this interval the fermentation is most vigorous.

that starters are not constant in their behaviour. Now and then analyses in the same starter were made twice, the second time after daily transmission for some time. As we can read form Fig. 15 the position of the starter on the second determination is more or less changed in the graph. It is possible that this is connected with the percentage of the daily transfer as by repeated large inoculations the rate of aromabetacocci in the starter may increase. In fact we were able to change the characteristics of self composed starters by transmitting different quantities (table 18), but with starters of the practice, in which the aromabetacocci are less sensible, we could not demonstrate it so clearly.

LITERATUUR

(1) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE. De ontleding van citroenzuur door boteraromabacteriën. *Versl. v. landbk. Onderz.* **44** (1938) 207. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1937, 111.

J. VAN BEYNUM and J. W. PETTE. The decomposition of citric acid by Betacoccus cremoris. *The journal of dairy research X* (1939) 250.

J. VAN BEYNUM. Die Tätigkeit der Aromabakterien in Säureweckern. 11. *Milchwirtschaftliches Weltkongress.* 1937, s. 70.

(2) J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE. De beteekenis der melkzuurbacteriën bij de boteraromavorming. *Versl. v. landbk. Onderz.* **42** (1936) 361. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1935, 205.

(3) J. VAN BEYNUM. Aromavorming door boteraromabacteriën. *Versl. v. landbk. Onderz.* **40** (1934) 355. Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1933, 65.

(4) B. W. HAMMER. *Journ. of Dairy Science* **18** (1935) 579.