

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

DE BETEEKENIS DER MELKZUURBACTERIËN BIJ DE  
BOTERAROMAVORMING,

DOOR

J. VAN BEYNUM en J. W. PETTE.

(Ingezonden 24 April 1936).

## I. INLEIDING.

Bij de boterbereiding heeft men zich steeds toegelegd op het verkrijgen van een gewenschten aromatischen geur aan de boter. Dit aroma bleek in nauwe betrekking te staan tot het voor de roomrijping gebruikte zuursel en wel in dien zin, dat bij gebruik van een aromatisch zuursel ook een boter met aroma werd verkregen. Het onderzoek van deze zuursels, door velen ter hand genomen, bracht in den loop der jaren eenige belangrijke feiten aan het licht <sup>1)</sup>.

Nadat men tot de overtuiging was gekomen, dat noch een reïncultuur van een melkzuurbacterie noch de combinatie van eenige reïncultures in staat was het boterzuursel te vervangen, wat betreft het aromavormend vermogen, heeft men zijn aandacht gevestigd op de naast de melkzuurbacteriën in zuursels voorkomende bacteriesoorten. Dit leidde tot de ontdekking van de z.g. aromabacteriën <sup>2)</sup>.

De aromabacteriën behooren volgens het schema van ORLA JENSEN <sup>3)</sup> tot de melkzuurbacteriën en wel tot de betacoccen. We zullen dus in het vervolg liever spreken van melkzuurstreptococcen en aromabetacoccen. Het typeerende onderscheid is de vorming van d-melkzuur door de streptococcen en van l-melkzuur door de betacoccen. Door KNUDSEN is voorgesteld de aromabacteriën met den naam *Betacoccus cremoris* aan te duiden.

Alle onderzoekers constateerden het feit, dat de combinatie van melkzuurbacteriën en aromabacteriën tezamen in melk geënt, deze melk na verloop van tijd een aromatischen geur deed verkrijgen volkomen gelijkend op die van een goed practijk-boterzuursel en welke in hooge mate het boteraroma nabijkwam. Deze geur is geheel verschillend van dien, welken reïncultures van melkzuurbacteriën aan de melk verschaffen. Deze waarnemingen werden in den loop der jaren bevestigd en uitgebreid, o.a. door een groot aantal roomzurings- en karnproeven door BOEKHOUT en VAN BEYNUM <sup>4)</sup>.

Een tweede belangrijk feit is het volgende. In 1929 gelukte het aan VAN NIEL, KLUYVER en DERX <sup>5)</sup> aannemelijk te maken, dat het belangrijkste bestanddeel van het boteraroma gevormd wordt door het diacetyl, welk diacetyl vermoedelijk zou ontstaan door oxydatie van acetyl-methyl-carbinol.

1936-247

Het spreekt wel haast vanzelf, dat de beantwoording van de vraag, op welke wijze door de samenwerking van melkzuurstreptococceen en aromabetacocceen het aroma, i.c. diacetyl, ontstaat, van groot belang mag worden geacht, niet alleen uit theoretisch oogpunt, doch vooral ook om het groote praktische belang, dat eraan ten grondslag ligt, n.l. de doelbewuste regeling van het aroma aan de boter.

De onderzoekingen, welke hierover in den loop der jaren zijn verricht, in hoofdzaak door VAN BEYNUM <sup>6)</sup> en HAMMER c.s. <sup>7)</sup>, betroffen voornamelijk de eigenschappen der aromabetacocceen. Beiden komen tot tamelijk overeenstemmende resultaten. Zoo vinden zij, dat vermoedelijk citroenzuur de bron van het aroma is, dat de verhooging van het vluchtig-zuur-gehalte bij een mengcultuur te wijten is aan de vorming van vluchtig zuur door de aromabacteriën uit dit citroenzuur en bovendien — wat in verband met deze verhandeling van belang is — dat de rol der melkzuurstreptococceen bij de samenwerking overgenomen kan worden door organische en anorganische zuren, m.a.w., dat de werking van de melkzuurstreptococceen alleen en uitsluitend zou berusten op het verwekken van een bepaalden gunstigen zuurgraad in de melk. Dit feit is nu in zooverre zeer merkwaardig, omdat in de zuivelwereld veelal de meening verkondigd wordt, dat slechts een zeer bepaalde groep van melkzuurstreptococceen, welke door ORLA JENSEN samengevat zijn onder den naam *Streptococcus cremoris*, zich tot aromavorming zou leenen. Indien nu echter de werking der melkzuurstreptococceen slechts neerkomt op de vorming van zuur, dan is zonder meer niet in te zien, waarom juist deze groep het aromavormingsproces gunstig zou beïnvloeden. Eerder zou men geneigd zijn aan te nemen, dat elke goed zurende melkzuurstreptococcus in staat moet zijn met een aromabacterie aroma te geven.

Uit de praktijk weten we echter, dat lang niet alle combinaties van melkzuurstreptococceen en aromabetacocceen geschikt zijn. De ongeschiktheid van een combinatie zou veroorzaakt kunnen worden door de eigenschappen der gebruikte aromabacterie of door die der gebruikte melkzuurstreptococcus. Wat dit laatste betreft gaven KLUYVER, VAN NIEL en DERX <sup>5)</sup> aan, dat *Streptococcus cremoris* in melk acetyl-methyl-carbinol vormt, in tegenstelling tot *Streptococcus lactis*. Waar nu acetyl-methyl-carbinol door hen opgevat wordt als de moederstof voor het hoofdbestanddeel van het boteraroma, n.l. diacetyl, zou men zich kunnen indenken, dat de groep *Streptococcus cremoris* naast haar zuurvorming een voor de aromavorming extra gunstige eigenschap bezat door deze vorming van acetyl-methyl-carbinol.

Wel is waar toonden A. D. ORLA JENSEN en P. HANSEN <sup>8)</sup> weldra aan, dat op de vorming van acetyl-methyl-carbinol geen onderscheid tusschen *Str. lactis* en *Str. cremoris* gebaseerd kon worden, doch anderzijds weten we dat

in zuursels *Str. cremoris* veelvuldig voorkomt, terwijl in spontaan gezuurde melk *Str. lactis* verreweg overheerscht. Voor dit overheerschen van *Str. cremoris* in zuursels is tot nu toe geen aannemelijke verklaring gevonden.

## II. WAT IS STREPTOCOCCUS CREMORIS?

Een onderzoek werd dus ingesteld naar de vraag of er zich onder de melkzuurstreptococceen een bepaalde groep bevindt, die bijzonder geneigd is de aromabacteriën bij hun aromavormingsproces te ondersteunen. Volgens de Deensche onderzoekers eigent zich hiervoor speciaal de groep *Streptococcus cremoris*. Nu heerscht er over het aromavormend vermogen van deze bacterie in de literatuur eenige verwarring, welke vermoedelijk voortspuit uit de omstandigheid, dat ORLA JENSEN zijn boek „The lactic acid bacteria” schreef in een tijd, die ongeveer samenviel met de ontdekking der aromabacteriën. Vóór dien tijd was men algemeen van meening, dat aroma gevormd werd door bepaalde stammen van melkzuurbacteriën. ORLA JENSEN zegt dan ook in zijn boek over *Str. cremoris* <sup>9)</sup>: „I have thus named the lactic acid bacteria first studied by STORCH, which, owing to its aroma formation has become generally used for souring cream in the manufacture of butter”. Deze uitspraak is het, die ook thans nog velen in de meening brengt, dat *Str. cremoris* *alleen* tot aromavorming in staat zou zijn.

Alvorens hierop nader in te gaan willen wij eerst nog even de vraag onder de oogen zien, naar welke door STORCH onderzochte bacterie ORLA JENSEN hier verwijst. In verband met de beschreven eigenschappen is het zeer waarschijnlijk dat hij de door STORCH als n°. 18 beschreven <sup>10)</sup> stam bedoelt. Ook eenige uitlatingen in de literatuur wijzen hier duidelijk op. Zoo lezen we in 1911 van de hand van ORLA JENSEN <sup>11)</sup> zelf: „Die besten der in Dänemark verwendeten Säurewecker bestehen aus zwei Streptokokken, einem dünneren (0,7—1  $\mu$  groszen), dem Bacterium lactis acidi ähnlichen Diplococcus und einer dickeren (1,5—2  $\mu$  groszen), in langen Ketten auftretenden Art, die an STORCH's n°. 18 erinnert . . . . . In der Praxis nehmen die dicken Streptokokken, die am meisten Aroma erzeugen, fast immer überhand, so dasz es vorzugsweise diese sind, welche in frischer dänischer Butter vorkommen”. Verder vindt men in FLEISCHMANN-WEIGMANN, 1932, pg. 545, reg. 23 vermeld: „Die von ihm (STORCH) als am geeignetsten befundene Bakterie n°. 18 ist später von S. ORLA JENSEN als besondere Art unter den Namen *Streptococcus cremoris* aufgestellt worden”.

Is nu deze *Str. cremoris* werkelijk alleen in staat, dus zonder medewerking van aromabacteriën, aroma te geven? Veelal vindt men deze meening verkondigd en ook ORLA JENSEN schrijft in 1926 <sup>12)</sup> . . . . . et tout porte à croire que, comme on l'admet encore couramment il suffit pour communiquer au

beurre un bon arôme, d'utiliser des cultures pures vigoureuses de la bactérie de STORCH pour l'acidification de la crème, bactérie que l'un de nous a étudiée de façon approfondie et qui a reçu le nom de *Sc. cremoris*'".

STORCH zelf was echter reeds lang teruggekomen van het idee, dat de soort, die ORLA JENSEN als *Str. cremoris* aanduidt, verantwoordelijk gesteld moet worden voor de aromavorming, hetgeen uit de publicatie van zijn nagelaten werk <sup>2)</sup> duidelijk blijkt. Ook hij geeft hierin aan, dat voor de aromavorming aromabacteriën, door hem hier x-bacteriën genoemd, noodzakelijk zijn.

Na deze vaststelling blijft echter de vraag te beantwoorden, in hoeverre *Str. cremoris* zich misschien in het bijzonder eigent tot samenwerking met aromabacteriën, in tegenstelling tot *Str. lactis*, m.a.w. of men zeggen kan, dat de combinatie van *Str. cremoris* met aromabacteriën (misschien dank zij de acetyl-methyl-carbinol-productie van *Str. cremoris*) leidt tot aromavorming en de combinatie *Str. lactis* met aromabacteriën niet.

### III. HET ONDERSCHIED TUSSEN *STR. LACTIS* EN *STR. CREMORIS*.

Het onderscheid tusschen *Str. cremoris* en *Str. lactis* door ORLA JENSEN aangegeven is niet zeer groot. *Str. cremoris* vormt in melk lange kettingen en is niet in staat maltose en dextrine te vergisten; *Str. lactis* daarentegen komt in melk hoofdzakelijk als duplococcon voor en vergist maltose en dextrine wel.

In het onderzoek werden betrokken 63 stammen, welke naar hun herkomst als volgt kunnen worden verdeeld.

Herkomst.	N <sup>o</sup> . der stammen.
Zuursel . . . . .	I, IV, V, XI, XII, XIV, XVI, XVII, XX, XXI, XXIII, XXVI, 15, 16, 17, 18, 19, R6, R7, R12, R13 en R14.
Spontaan gezuurde melk . .	9, 13, 21, 24, 26, 28, 30, 31, 34, 35, 36, 38, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 59, 60, 65, 66, 67 en 68.
Lange wei . . . . .	10, 12, 62 en 63.
Wei . . . . .	S9, W1, W2 en W3.
Kaas . . . . .	25, 37, 42, 43, S10 en 14.
Aardappelvezels . . . . .	51.
Van S. KNUDSEN . . . . .	7 en 8.

(4) C. 76.

De 22 uit zuursel afkomstige stammen waren geïsoleerd uit 13 verschillende zuursels, de uit spontaan gezuurde melk afkomstige uit 5 verschillende monsters.

De van S. KNUDSEN afkomstige stammen werden ons op ons verzoek door hem toegezonden, als voorbeelden van *Str. cremoris*, voor welke bereidwilligheid we hem gaarne onzen dank zeggen.

Na reincultiveering op weigelatine werden de stammen aangehouden door regelmatige overenting in centrifugemelk. Die melkzuurbacteriën, welke binnen 3 dagen bij 21° stremden, werden tweemaal per week overgeënt, de langzamer zurende éénmaal per week met 4 mgr per 30 cc. Contrôles op reinheid werden geregeld verricht. Alle stammen waren katalase-negatief en gram-positief, terwijl zij microscopisch bestonden uit duplo- of/en streptococcen. *De vorm der bacterien* werd nagegaan in de gestremde melkcultuur, welke voor de vervaardiging van het praeparaat met ammonia of loog werd geneutraliseerd, alsook bij de Gram-kleuring. Deze beide waarnemingen bleken volkomen overeen te stemmen, zoodat met opgave van één waarneming volstaan kan worden. Om eenigen indruk te geven van de lengte der kettingen werd in eenige velden het kleinste en het grootste aantal coccen, waaruit 1 streptococcus was opgebouwd, geteld. Deze cijfers vindt men in de tabellen I, II en III in kolom 3. Vindt men hierin dus vermeld 10—30, dan wil dit zeggen, dat de kleinste waargenomen streptococcus uit 10 coccen bestond, de grootste uit 30. Zoo beteekent 2, dat de betreffende stam uitsluitend duplococcon vormde.

Van alle cultures werd *de stremtijd* bepaald op de bij ons gebruikelijke wijze. De opgegeven stremtijd berust op een waarneming om de 24 uren. Een stremtijd van 2 dagen wil dus zeggen, dat de melk gestremd is tusschen 24 en 48 uren na de enting van het kolfje met 30 cc centrifugemelk met een groot oog (4 mg) van een gestremde cultuur.

De *acetyl-methyl-carbinol-reactie* werd uitgevoerd volgens de methode LEMOIGNE-VAN NIEL<sup>13)</sup>. Na elke bepaling werd het geheele toestel uitgestoomd. De bepalingen werden verricht in 30 cc en de opbrengst aan dimethylglyoxim geschat, daar het er voor ons slechts op aankwam of er al dan niet acetyl-methyl-carbinol gevormd was. Om eenig houvast aan de beoordeelingen te hebben moge de volgende maatstaf dienen.

--	negatief			
±	enkele naalden op het grensvlak			
+	± 1	mg	Ni-dimethylglyoxim	
++	± 2½	„	„	„
+++	± 5	„	„	„
++++	+ 10	„	„	„
+++++	± 15	„	„	„

Voor de *maltosevergisting* werd een voedingsvodem met 2% Pepton Witte, 2% maltose en voedingszouten gebruikt. Na neutraliseeren op lakmoes en filtreren werd telkens 10 cc in buizen gepipetteerd en gesteriliseerd. In deze buizen werden de stammen geënt met een groot oog en na 1 week bij 21° overgeënt. Vervolgens werd na 2 weken getitreerd met 0,1 n. NaOH en phenolphthaleïne als indicator. Het gevonden aantal cc 0,1 n. NaOH werd verminderd met het gebruikte aantal cc NaOH bij ongeënte contrôlebuizen.

In de tabel wordt dus de gevormde hoeveelheid zuur opgegeven. Alle bepalingen werden in twee- of meervoud verricht en eenige malen herhaald voor die stammen, die niet in staat bleken maltose te vergisten. Het resultaat bleef echter geheel gelijk.

Het vermogen tot *dextrinevergisting* werd op gelijke wijze nagegaan. In plaats van 2% maltose werd thans 2% dextrine aan den bodem toegevoegd.

De resultaten der verrichte proeven zijn in drie tabellen samengevat.

TABEL I.

*Uit zuursel geïsoleerde stammen. 1932.*

Stam N°.	Stremt melk bij 21° in dagen.	Aantal coccen per ketting.	Acetyl- methyl- carbinol- reactie.	Vergisting van		Afwijkende geuren van de melkcultuur.	
				<i>maltose</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	<i>dextrine</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.		
I	1	4—8	++	0,0	0,0		
IV	1	4—8	++	0,0	0,0		
V	1	10	++	0,0	0,0		
XI	5	10—20	+++	0,0	0,0		
XII	3	10—20	++	0,0	0,0		
XIV	4	2—4	++++	0,0	0,0		
XVI	1	2—8	++	1,4	0,0		
XVII	3	2—10	±	2,0	0,0		
XX	4	2—10	+	0,0	0,0		
XXI	3	10—30	±	0,2	0,0		
XXIII	2	2	±	2,6	1,8		
XXVI	4	2	+	3,0	1,6		branderig
15	1	2—20	—	1,7	2,1		
16	1	10—60	+	0,8	1,5		
17	1	2—20	—	0,7	1,8		
18	1	2—20	++	0,2	0,0		
19	1	2—20	+	0,1	0,4		
R6	2	50—100	+	0,0	0,0		
R7	2	20—50	++	0,0	0,0		
R12	1	2	++	2,8	1,9		branderig
R13	1	2—10	++	0,1	0,0		
R14	2	20—50	±	0,0	0,0		

TABEL II.

*Uit spontaan gezuurde melk geïsoleerde stammen. 1932.*

Stam N°.	Stremt melk bij 21° in dagen.	Aantal coccen per ketting.	Acetyl-methyl-carbinol-reactie.	Vergisting van		Afwijkende geuren van de melkcultuur.
				<i>maltose</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	<i>dextrine</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	
9	2	2	±	2,9	2,0	wrang
13	3	2	+++	3,0	2,0	
21	2	2	++++	2,9	2,1	
24	2	2-8	±	2,7	2,0	
26	1	2-10	+	2,7	2,0	
28	1	2-8	++	3,1	2,3	
30	1	2-6	-	1,9	2,3	
31	1	2	±	2,8	2,3	
34	3	2	±	2,6	2,3	
35	3	2	+	2,9	2,3	
36	3	2	+++	2,9	2,3	
38	3	2	+	2,6	2,3	
40	1	2	++	3,0	2,4	branderig
44	4	2	-	2,6	2,6	
45	3	2	-	2,7	2,4	
46	4	2-8	++	2,9	2,2	
47	3	2-10	+++	2,5	2,4	
48	1	2	±	3,1	2,8	cacaogeur
59	1	2-10	+	2,8	2,2	wrang
60	2	2	++++	2,8	2,2	
65	4	2-8	+	2,3	1,9	
66	3	2	+	1,8	1,0	
67	4	2-8	++	2,5	2,3	
68	2	2-10	±	2,4	1,7	

TABEL III.

*Uit andere bronnen verkregen stammen. 1932.*

Stam N°.	Afkomstig van	Stremt melk bij 21° in dagen.	Aantal coccen per ketting.	Acetyl-methyl-carbinol-reactie.	Vergisting van		Afwijkende geuren van de melkcultuur.
					<i>maltose</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	<i>dextrine</i> gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	
10	Lange wei	2	2-60	±	1,5	1,1	branderig
12	" "	2	2	-	3,2	2,2	
62	" "	1	2	-	1,0	1,7	
63	" "	3	2-10	++	0,6	0,0	
S9	Wei . . .	4	2	±	2,4	2,2	diacetyl diacetyl diacetyl
W1	" . . .	6	2-20	++++	0,0	0,0	
W2	" . . .	6	2-20	+++	0,0	0,0	
W3	" . . .	5	2-20	++++	0,0	0,0	

Stam N <sup>o</sup> .	Afkomstig van	Stremt melk bij 22° in dagen.	Aantal coccen per ketting.	Acetyl-methyl-carbinol-reactie.	Vergisting van		Afwijkende geuren van de melkcultuur.
					maltose gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	dextrine gevormd 0,1 n. zuur per 10 cc.	
25	Kaas . .	2	2—4	++++	3,1	2,4	zwak branderig
37	" . .	3	2	+++	2,8	2,4	
42	" . .	2	2	++	2,1	2,4	
43	" . .	3	2	+++++	2,3	2,5	
S10	" . .	4	2	—	2,2	1,5	
14	" . .	5	2—10	++++	0,0	0,0	diacetyl
51	Aardappel-vezels .	2	2	++	2,7	2,5	zwak branderig
7	S. KNUDSEN	6	2—20	++++	0,0	0,0	
8	"	6	2—30	++++	0,0	0,0	

Indien we de resultaten overzien, dan valt inderdaad op, dat er een onderscheid te maken is tusschen melkzuurstreptococcen, die maltose en dextrine wel kunnen vergisten en die hiertoe niet of bijna niet in staat zijn. Vasthoudende aan de nomenclatuur van ORLA JENSEN kunnen wij de eerstgenoemde met *Streptococcus lactis* betitelen, de laatstgenoemde met *Streptococcus cremoris*. Opgemerkt dient te worden, dat zooals gewoonlijk in de bacteriologie enkele stammen niet duidelijk te klassificeeren zijn, nl. XVI, XVII, 16 en 17.

Bij een later verricht onderzoek der stammen in verdunde gistaulysaat werd hetzelfde beeld verkregen. Alleen vertoonden in deze vloeistof de nummers 18 en 19 maltose- en dextrine-aantasting, zoodat zij toch misschien tot de groep *Str. lactis* gerekend moeten worden.

Zeer sprekend is het feit, dat bijna alle uit zuursels geïsoleerde stammen tot de groep *Str. cremoris* behooren, terwijl *alle* stammen uit spontaan gezuurde melk *Str. lactis* genoemd moeten worden. Van de vijf monsters melk, die voor deze spontane zuring werden gebruikt, was er één afkomstig van de boterfabriek der Proefzuivelboerderij in de verwachting dat hier een infectie der melk met *Str. cremoris*-kiemen het meest waarschijnlijk was. Dit bleek echter niet het geval. Hoewel verder *Str. lactis* duidelijk minder geneigd blijkt tot het vormen van lange kettingen in melk, in tegenstelling tot *Str. cremoris*, lijkt ons dit onderscheid toch zoo subtiel, waar het ongetwijfeld afhankelijk is van geringe verschillen in de omstandigheden, dat men beter doet dit onderscheid te laten varen. Niettemin is het in zijn algemeenheid wel juist.

We kunnen nu de acetyl-methyl-carbinol-vorming der stammen van beide groepen met elkaar vergelijken.



TABEL IV. 1932.

Streptococcus cremoris.				Streptococcus lactis.							
N°.	a.m.c.	N°.	a.m.c.	N°.	a.m.c.	N°.	a.m.c.	N°.	a.m.c.	N°.	a.m.c.
I	++	19	+	XXIII	±	28	++	44	—	67	++
IV	++	63	++	XXVI	+	30	—	45	—	68	±
V	++	R6	+	9	±	31	±	46	++	R12	++
XI	+++	R7	++	10	±	34	±	47	+++	S 9	±
XII	++	R13	++	12	—	35	+	48	±	S10	—
XIV	++++	R14	±	13	+++	36	+++	51	+		
XX	+	W1	++++	15	—	37	+++	59	+		
XXI	±	W2	++++	21	++++	38	+	60	++++		
7	++++	W3	++++	24	±	40	++	62	—		
8	++++	14	++++	25	++++	42	++	65	+		
18	++			26	+	43	++++	66	+		

Uit deze tabel blijkt duidelijk, dat er geen sprake van een wetmatigheid is dat *Str. cremoris* acetyl-methyl-carbinol vormt en *Str. lactis* niet.

Men kan echter ook de melkzuurstreptococci gaan verdeelen in stammen, die veel acetyl-methyl-carbinol geven en die dit weinig of niet doen. Deze verdeling lijkt in verband met het aromaprobleem veel rationeeler, immers het voor het aroma verantwoordelijke diacetyl is chemisch ten nauwste met het acetyl-methyl-carbinol verwant. Een nader onderzoek zal moeten leeren in hoeverre een grotere productie van acetyl-methyl-carbinol door de melkzuurstreptococcus het aromavormend vermogen van de combinatie van een melkzuurstreptococcus en aromabetacoccus gunstig beïnvloedt.

#### IV. RUIKPROEVEN.

Om uit te maken of er zich onder de melkzuurstreptococci een bepaalde groep bevond, welke zich bijzonder tot samenwerking leende, hetzij dat dit de *Str. cremoris*-groep was of misschien de groep der acetyl-methyl-carbinol-produceerenden moest overgegaan worden tot het nemen van ruikproeven.

Het spreekt wel vanzelf, dat voor het nemen van deze ruikproeven alleen de snelzurende melkzuurstreptococci in aanmerking komen, waar een snelle verzuring voor het optreden van het aroma een vereischte is. Gebruikt werden Nos. I, IV, V, XVI, 9, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 40, 42, 45, 59, 62, 68, R6, R7, R13 en R14.

Als aromabetacocci werden de in onze verzameling aanwezige Nos. a, a1, a5, a6, a7, a8 en d genomen. Zij zijn geïsoleerd uit verschillende zuursels.

Het zijn alle korte streptococcen, niet in staat om melk tot stremming te brengen, terwijl ze hierin in reïncultuur geen acetyl-methyl-carbinol produceeren.

Het aantal combinaties tusschen deze 27 streptococcen en 7 betacoccen bedroeg dus 189.

De uitvoering der ruikproeven geschiedde als volgt. Van een gestremde 3 à 4 dagen oude cultuur van een melkzuurstreptococcus in centrifugemelk werd 1 groot oog overgeënt in een rondkolfje van 100 cc, waarin zich 30 cc centrifugemelk bevond. Hierbij werd geënt 1 groot oog van een 1 week oude cultuur in centrifugemelk van een aromabetacoccus en het kolfje bij 21° C geplaatst. Meestal na 3 of 4 dagen werd deze mengcultuur overgeënt, wederom met 1 groot oog in een kolfje van 100 cc met 30 cc centrifugemelk. De hals van dit kolfje mag niet te nauw zijn en moet volkomen gaaf zijn, terwijl de wattenprop droog moet zijn en blijven. De overgeënte mengcultures werden geplaatst in een thermostaat bij 21°. Ter vergelijking werden ook de reïncultures der betreffende melkzuurstreptococcen aan de groep toegevoegd. Het aantal tegelijk ingezette cultures bedroeg niet meer dan 30 à 40 stuks daar bij een grooter aantal een zekere ruikvermoeidheid bij de proefpersonen optrad. De kolfjes werden door elkaar in den thermostaat geplaatst en op een aantal achtereenvolgende dagen geroken door 3 personen, die niet op de hoogte waren welke cultures zich in de kolfjes bevonden en die door goede oefening uitstekend het aroma konden onderkennen. De kolfjes werden meestal op den 3den dag (soms al op den 2den) voor het eerst geroken en vervolgens alle volgende dagen, totdat de cultuur beschimmelde of de proef werd afgebroken. Waar dus een cultuur altijd minstens 3 dagen achter elkaar beoordeeld werd en soms wel 8 dagen door 3 personen, wordt dus het al of niet aanwezig zijn van aroma afgeleid uit 9 tot 24 waarnemingen. In bijna alle gevallen bleek dan ook bij een dergelijk tijdsverloop een zeer groote overeenstemming tusschen de beoordeelingen der verschillende proefpersonen te bestaan. Mocht één der keurders al eens een dag niet gedisponeerd zijn geweest, dan bleek dat den volgende dag.

Bij den gegeven vorm der ruikkolfjes bleek het aroma meestal pas duidelijk ruikbaar op den 3den of 4den dag. De volgende onderscheiding werd gebruikt:

geen aroma	}	g	= goor. Een onaangename wrange geur, die reïncultures van melkzuurstreptococcen gewoonlijk in meerdere of mindere mate eigen is.
		i.g.	= iets goor. Dezelfde geur, doch in mindere mate.
		n.	= neutraal. De cultuur ruikt aangenaam, doch beslist niet aromatisch.

geen aroma } z.z.a. = een zeer zwakke aromageur; meer dan een aanwijzing is het niet. Blijkt den volgenden dag, dat de cultuur toch neutraal ruikt, dan is de waarschijnlijkheid groot, dat men zich in het constateeren van deze moeilijk te bepalen gradatie vergist heeft.  
 uitgesproken } z.a. = zwak aroma. Het aroma is duidelijk, doch zwak.  
 aroma } a. = aroma. Behoorlijk sterk aroma.  
 } b.a. = best aroma. Bijzonder fijne geur.  
 } diac. = diacetylgeur; deze sterke geur is minder aangenaam dan de frissche, milde zuurselgeur. Men zou hier van te krachtig aroma kunnen spreken.

Een enkel voorbeeld van een goed en een niet goed geslaagde combinatie moge de gevolgde werkwijze illustreeren.

TABEL V.

Combinatie.	Ingezet.	Overgeënt.	Stremming bij 21° na dagen.	Geroken na dagen.										
				2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	
V	19-11 '32		1	g.	g.	ig.	g.	ig.			ig.			
V + a	16-11 '32	19-11 '32	1	g. zuur	ig.	n.	n.	ig. scherp						
V + a1	16-11 '32	19-11 '32	1	ig.	g.	n.	n.	ig. scherp						
V + a5	26. 1 '33	30. 1 '33	1			n.	n.	ig. scherp	n.					
V + a6	16-11 '32	19-11 '32	1	g.	g.	n.	n.	ig. scherp						
V + a7	26. 1 '33	30. 1 '33	1			n.	n.	ig. scherp	z.z.a.	n.	n.			
V + a8	26. 1 '33	30. 1 '33	1			n.	n.	ig. scherp	n.	n.	n.			
V + d	16-11 '32	19-11 '32	1	g.	g.	n.	n.	ig. scherp						
XVI	26-11 '32		2		g.	ig.		g.	g.	ig.				
XVI + a	23-11 '32	26-11 '32	1		z.z.a.	z.a.		g. a.	g. b.a.	ig. n.				
XVI + a1	23-11 '32	26-11 '32	1		z.a.	a.		a.	b.a.					
XVI + a5	26. 1 '33	30. 1 '33	1			a.	b.a.	b.a.	a.	a.	z.a.			
XVI + a6	23-11 '32	26-11 '32	1		n.	a.		z.a.	a.					
XVI + a7	26. 1 '33	30. 1 '33	1½			b.a.	b.a.	b.a.	a.	b.a.	a.	a.	a.	
XVI + a8	26. 1 '33	30. 1 '33	1½			z.a.	a.	b.a.	a.	b.a.	a.	b.a.	a.	
XVI + d	23-11 '32	26-11 '32	1		z.a.	z.a.		z.a.	a.		n.			

We zien dus duidelijk, dat n°. V met geen der aromabacteriën aroma gaf en n°. XVI met alle. Een overzicht van alle combinaties geeft tabel VI, waarbij dus met + en — is aangeduid of al dan niet op de bovenomschreven wijze tot aromavorming geconcludeerd kon worden, terwijl ± aangeeft, dat het resultaat twijfelachtig was.

TABEL VI. 1933.

Type Streptococcus.	N <sup>o</sup> .	Betacoccus.						
		a.	a1.	a5.	a6.	a7.	a8.	d.
crem.	I	+	+	—	+	+	±	+
crem.	IV	+	+	—	+	+	—	+
crem.	V	—	—	—	—	—	—	—
?	XVI	+	+	+	+	+	+	+
lactis	9	±	+	—	—	+	+	—
lactis	15	+	+	—	+	±	+	+
?	16	—	+	—	+	±	+	+
?	17	+	+	—	—	+	—	+
crem.	18	+	+	+	+	+	+	+
crem.	19	+	+	—	+	+	+	+
lactis	21	+	—	—	+	+	+	+
lactis	24	+	+	+	—	+	+	—
lactis	26	+	+	—	—	+	+	±
lactis	28	—	+	+	+	+	+	+
lactis	30	+	+	+	+	+	+	+
lactis	31	—	+	+	—	+	+	±
lactis	40	+	+	+	+	+	+	+
lactis	42	+	—	+	+	+	+	—
lactis	45	—	+	+	—	+	+	—
lactis	59	+	+	—	+	—	—	—
lactis	62	+	+	—	—	—	—	—
lactis	68	—	—	—	±	—	—	—
crem.	R6	+	+	+	+	+	+	+
crem.	R7	+	+	—	+	+	—	—
crem.	R13	+	—	+	—	+	+	+
crem.	R14	—	+	+	+	±	+	—

Stam n<sup>o</sup>. 25 is buiten beschouwing gelaten, daar hij een te sterk branderigen geur bezat, welke de ruikresultaten onbetrouwbaar maakte.

Overzien we de resultaten, dan valt allereerst op te merken, dat van de 182 combinaties 119 aroma hebben gegeven, 55 niet, terwijl in 8 gevallen twijfel bestaat. We zien echter dadelijk, dat er geen sprake van een vaste lijn is. Verhoudingsgewijs blijkt wel bij a5 het aantal mislukkingen het grootst.

Is *Str. cremoris* meer geneigd tot aromavorming dan *Str. lactis*? Toetsen we dit even aan een paar voorbeelden. Zoo zien we dat speciaal *Str. cremoris* n<sup>o</sup>. V zeer slechte resultaten heeft gegeven. De andere vertegenwoordigers hiervan zijn veel beter (I, IV, 18, 19, R6, R7, R13 en R14). Ook onder de *Str. lactis*-stammen treffen we minstens gelijkwaardige vertegenwoordigers aan. Noemen we b.v. 21, 24, 28, 30 en 40. En hoe is het met het verband tusschen acetyl-methyl-carbinol-productie en de neiging tot aromavorming? We behoeven hier slechts te wijzen op n<sup>o</sup>. 15 en 30, welke beide geen acetyl-methyl-carbinol in melk vormen (zie tabel IV), doch bij de aromavorming beste resultaten hebben gegeven.

De negatieve resultaten schijnen willekeurig over de geheele proef verdeeld, hetgeen de verdenking doet opkomen, dat misschien een toevallige factor een belangrijke rol zou spelen.

## V. DE INVLOED VAN EENIGE FACTOREN BIJ DE RUIKPROEVEN.

Aan de hand van enkele ruikproeven, die verder geheel op dezelfde wijze werden ingericht, werd nu het volgende nagegaan.

*a. Invloed van den dag, waarvan de melk afkomstig is.* Gebruikt werd steeds gemengde morgenmelk van de Proefzuivelboerderij, welke in de boterfabriek gecentrifugeerd werd. Nadat nu de gebruikte combinaties op 20 Maart 1933 in kolfjes melk waren geënt, werden zij op 24 Maart overgeënt in melk van respectievelijk 20, 22 en 23 Maart. Zie tabel VII.

Het resultaat is niet twijfelachtig. In alle 3 gevallen wordt dezelfde uitkomst verkregen. Het gebruik van centrifugemelk van verschillenden dag, mits mengmelk, schijnt geen bezwaren op te leveren.

Een ander sprekend resultaat van deze serie is, dat waar de gebruikte combinaties in 5-voud zijn uitgevoerd, de verkregen uitkomsten in alle vijf gevallen zeer goed overeenkomen.

*b. Invloed van citraattoevoeging.* Getracht werd door toevoeging van natriumcitraat aan de melk de ruikresultaten te verduidelijken. Eerstens zou men zich kunnen voorstellen, dat de melk op sommige dagen aanmerkelijk minder citroenzuur zou bevatten dan normaal, waarop evenwel bij mengmelk de kans niet groot lijkt en waarvoor we in den loop der jaren ook nog geen enkele aanwijzing hebben gekregen, doch in de tweede plaats lijkt het mogelijk, dat door verhooging van het citroenzuurgehalte ook een verhoogd aroma-gehalte zou worden verkregen, daar citroenzuur als de bron van het aroma wordt beschouwd.

Toevoeging van extra citroenzuur (in den vorm van 3,1 g natrium-citraat 5 aq. per l melk) had echter absoluut geen krachtiger aroma-vorming ten gevolge, zooals vroeger reeds geconstateerd was<sup>14</sup>). Aan de hand van 35 combinaties werd dit nagegaan. De verkregen resultaten weken bovendien in menig opzicht af van die, welke in tabel VI werden neergelegd. Zoo gaf stam n°. 30 thans geen aroma met a, a5, a7 en d, stam n°. XVI niet met a5 en a6, n°. 21 thans wel met a1, in tegenstelling tot vroeger, etc..

*c. Invloed van den tijd bij de overenting.* Zooals bekend is verdragen de aromabetaococceen een hooger en zuurgraad dan de melkzuurstreptococceen.

TABEL VII.

Combinatie.	A. 20 Maart. Geroken na dagen.										B. 22 Maart.					
	4.	5.	6.	7.	8.	10.	11.	13.	15.	18.	4.	5.	6.	7.	8.	
IV + a1	(1)	z.z.a.	z.a.	z.a.	z.a.	z.a.	a.	z.a.	z.z.a.			z.a.	z.a.	a.	a.	a.
	(2)	z.a.	z.a.	z.z.a.	z.a.	a.	z.a.	z.a.	z.z.a.			z.a.	a.	z.a.	z.a.	z.a.
	(3)	z.z.a.	a.	z.a.	a.	a.	z.a.	z.a.	z.z.a.			a.	z.a.	a.	a.	a.
	(4)	z.a.	z.a.	a.	a.	a.	a.	z.a.	z.a.			z.z.a.	a.	a.	a.	z.a.
	(5)	z.a.	a.	z.a.	z.a.	a.	a.	a.	z.a.			z.z.a.	a.	a.	a.	a.
IV + d	(1)	n.	z.a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	n.	z.a.	a.	a.	b.a.
	(2)	n.	z.z.a.	z.z.a.	a.	b.a.	a.	z.a.	z.a.			n.	z.z.a.	a.	a.	a.
	(3)	z.a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	n.	z.z.a.	a.	a.	a.
	(4)	z.z.a.	z.a.	z.a.	b.a.	a.	b.a.	b.a.	a.	a.	a.	n.	z.z.a.	a.	a.	a.
	(5)	n.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.			n.	z.z.a.	a.	b.a.	a.
IV + a5	(1)	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.			n.	n.	ig.	n.	ig.
	(2)	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.			ig.	n.	ig.	ig.	ig.
	(3)	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.		n.	n.	ig.	ig.	ig.
	(4)	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	n.	n.	ig.	ig.	ig.
	(5)	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.			n.	n.	ig.	ig.	ig.
IV	(1)	ig.	g.	ig.	g.	g.	ig.	g.	ig.			n.	n.	g.	ig.	g.
	(2)	ig.	ig.	g.	g.	g.	ig.	g.	ig.	ig.		n.	n.	g.	ig.	g.

Zij kunnen nog groeien bij zuurgraden, waarbij de melkzuurstreptococci geen groei meer vertoonen. Bovendien kan men a priori niet verwachten, dat de groeicurven van beide soorten van bacteriën gelijk verlopen. Het is dus mogelijk, dat tijdens de zuring de verhouding tusschen het aantal aromabeta-cocci en melkzuurstreptococci belangrijke wijzigingen kan ondergaan. De vraag rees dus of het overent, 3 of 4 dagen nadat de combinatie ingezet was, wel gunstig was. Vergeleken werd daarom een serie, waarbij respectievelijk overgeënt werd na 2, 4 en 7 dagen. De resultaten in deze 3 groepen waren volkomen analoog. Binnen zekere grenzen doet het er dus niet zoo veel toe, na hoeveel dagen men overent. Een tijd van 4 dagen werd dus als normaal gehandhaafd.

Wederom viel op, dat echter verschillende resultaten niet overeenkwamen met de in tabel VI vermelde. Zoo was IV + a5 thans positief, 15 + a6 negatief.

d. *Invloed van den vorm der ruikkolf.* Naast elkaar werden dezelfde combinaties vergeleken in onze ruikkolfjes van 100 cc, hooge smalle vaten en Erlenmeyers van 300 cc. In alle ruikvaten werd volstaan met 30 cc melk.

Geroken na dagen.					C. 24 Maart.										Geroken na dagen.				
10.	11.	13.	15.	18.	4.	5.	6.	7.	8.	10.	11.	13.	15.	18.					
z.a.	a.	a.	z.a.		z.z.a.	a.	z.a.	z.a.	a.	a.	z.a.	z.a.	z.a.						
a.	z.a.				z.a.	z.a.	z.a.	z.a.	a.	a.	z.a.	z.a.	a.						
a.	z.a.	z.a.			z.a.	z.a.	z.z.a.	z.a.	a.	z.a.	z.a.	a.							
z.a.	z.a.	a.			z.a.	z.a.	z.a.	z.a.	a.	a.	z.z.a.	z.a.	a.						
a.	a.	a.			n.	z.a.	z.a.	a.	b.a.	a.	a.	a.	a.	a.					
a.	a.	z.a.	a.	a.	n.	z.z.a.	z.a.	z.a.	a.	a.	z.a.	a.	a.	a.					
a.	z.a.	a.	a.	a.	n.	z.a.	z.a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	z.a.					
z.a.	a.	a.	a.		n.	n.	b.a.	a.	a.	a.	a.	a.	a.	z.a.					
a.	a.	a.			n.	z.a.	a.	a.	a.	a.	a.	z.a.		a.					
ig.	ig.				n.	n.	g.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.							
ig.	ig.	ig.	ig.		n.	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.							
ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.					
ig.	ig.	ig.			n.	n.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.	n.					
ig.	g.	ig.	ig.	ig.	ig.	g.	g.	g.	g.	ig.	ig.	ig.	ig.	ig.					
ig.	ig.	ig.	ig.		n.	n.	g.	ig.	ig.	ig.	g.	ig.	ig.						

Het oppervlak der vloeistof in deze 3 modellen bedroeg respectievelijk  $\pm 28$ ,  $\pm 7$  en  $\pm 50$  cm<sup>2</sup>.

Het resultaat was niet twijfelachtig. De hooge vaten waren ten eenenmale ongeschikt. Het aroma was niet waarneembaar. Tusschen de Erlenmeyers en de ruikkolfjes bestond weinig verschil. Weliswaar was bij de dunne lagen het aroma dikwijls eerder ruikbaar en krachtiger, daartegenover stond dat vermoedelijk door de oxydatie van het melkvet veel sneller bijgeuren beginnen op te treden. Daar nu bovendien dergelijke groote kolven veel plaats in den thermostaat innemen, werden de gebruikelijke ruikkolfjes gehandhaafd. Een werkelijk opvallend verschil door gebruik van Erlenmeyers werd slechts gevonden bij stam n°. 21 en zijn combinaties. Deze krachtige acetyl-methyl-carbinol-vormende melkzuurstreptococcus wijkt echter belangrijk af van de andere gebruikte melkzuurstreptococci, waarop we later zullen terugkomen.

e. *Invloed van den groei der aromabacterien.* Bij de in tabel VII vermelde resultaten is een belangrijk verschil tusschen de samenwerking van IV met de betacocci a1, d en a5. Met de eerste twee werd goed aroma gevormd. met de laatste totaal niet.

Bij deze proef werd ook een citroenzuurbepaling verricht. Het bleek, dat het citroenzuur bij de laatste combinatie niet omgezet was, bij de eerste twee wel. Nadat afgestreken was op wei-gelatine bleek dan ook, dat de aromabetaococci a1 en d goed gegroeid waren, in tegenstelling tot a5, welke blijkbaar in het geheel niet op gang was gekomen. De oorzaak van het ontbreken van het aroma was dus het niet aanslaan van de aromabacterie bij het maken der mengcultuur. Nu was deze combinatie IV + a5 in de verschillende hierboven vermelde proeven gebruikt.

Overzien we de resultaten, met deze combinatie in de verschillende proefreeksen verkregen, dan zien we het volgende:

TABEL VIII.

Combinatie IV + a5.		
Geroken na		
3 dagen.	4 dagen.	5 dagen.
n.	z.a.	n.
a.	b.a.	b.a.
a.	b.a.	z.a.
a.	a.	z.a.
n.	z.z.a.	z.z.a.
g.	n.	n.
—	i.g.	n.

Het lag dus voor de hand hieraan de conclusie te verbinden, dat het al of niet optreden van het aroma ten nauwste samenhangt met het al of niet groeien van de aromabacteriën. De ruikproeven moesten dus voor een goede interpretatie herhaald worden met een gelijktijdige controle van den groei der aromabacteriën.

## VI. HERHALING DER RUIKPROEVEN.

Nadat in eenige voorloopige proeven inderdaad bevestigd was dat controle van den groei der aromabacteriën noodig is, werden alle combinaties nogmaals samengesteld. De groeicontrôle geschiedde na eenig experimenteren als volgt het beste.

Op 2 verschillende tijdstippen, meestal op den 4den en den 7den dag na de overenting (dus gedurende de ruikproef), werd een groot oog der gestremde melkcultuur der combinatie in 10 cc steriel 0,75 %ige keukenzoutoplossing



gebracht, goed geschud en hiervan een oog afgestroken op weigelatine, welke bij 21° werd bebroed. Zoo werden mooie losliggende koloniën verkregen, waaronder na eenige oefening de gebruikte aromabetacocceen aan hun vorm duidelijk herkend konden worden. Weliswaar lijkt het in het algemeen niet mogelijk koloniën van melkzuurstreptococceen en betacocceen op het oog te onderscheiden, doch indien men een combinatie van 2 stammen heeft en men gebruikt steeds dezelfde aromabacteriën, dan kan men wel uitmaken of de combinatie aangeslagen is of niet, daar men de kolonietypes van een dergelijk zelf samengesteld mengsel kent. Bleek de combinatie niet aangeslagen te zijn, dan werd ze herhaald en met eenige hulpmiddelen getracht de aromabacteriën bij de samenenting een betere groei kans te geven en wel

- 1°. door de aromabacteriën  $\pm$  16 uren eerder te enten,
- 2°. door de aromabacteriën in grooter hoeveelheid te enten,
- 3°. door toevoeging van een druppel gistautolysaat en
- 4°. door het toepassen van meerdere van deze hulpmiddelen te gelijk.

Inderdaad gelukte het op deze wijze alle combinaties te doen slagen.

De ruikresultaten zijn verwerkt in tabel IX (op dezelfde wijze als bij tabel VI).

TABEL IX.

Strepto- coccus.	N°.	Betacoccus.						
		a.	a1.	a5.	a6.	a7.	a8.	d.
cremoris	I	+	+	+	+	$\pm$	$\pm$	$\pm$
cremoris	IV	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	V	+	+	+	+	+	+	+
?	XVI	+	+	+	+	+	+	+
lactis	9	+	+	+	+	+	+	+
lactis	15	+	+	+	+	+	+	+
?	16	+	+	+	+	+	+	+
?	17	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	18	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	19	+	+	+	+	+	+	+
lactis	21	+	+	+	+	+	+	+
lactis	24	$\pm$	+	+	+	+	+	+
lactis	26	+	+	+	+	+	+	+
lactis	28	+	+	+	+	+	+	+
lactis	30	+	+	+	+	+	+	+
lactis	31	+	+	+	+	+	+	+
lactis	40	+	+	+	+	+	+	+
lactis	42	+	+	+	+	+	+	+
lactis	59	+	+	+	+	+	+	+
lactis	62	+	+	+	+	+	+	+
lactis	68	+	+	—	+	+	+	+
cremoris	R6	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	R7	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	R13	+	+	+	+	+	+	+
cremoris	R14	+	+	+	+	+	+	+

De conclusie waartoe de resultaten, vereenigd in tabel IX, leiden is eenvoudig. Het is altijd mogelijk aromavorming te verkrijgen door samenwerking van een snelstremmende melkzuurstreptococcus en een aromabetacoccus, mits er gezorgd wordt voor een goeden groei der beide soorten en ongeacht de acetyl-methyl-carbinol-productie der betreffende melkzuurstreptococcus, terwijl het feit of deze een *Str. cremoris* of *Str. lactis* is blijkbaar niet ter zake doet.

Het niet slagen van een combinatie moet in de eerste plaats gezocht worden in de specifieke eigenschappen der gebruikte aromabacterie. Zoo was betacoccus n°. a5 bijna altijd zeer moeilijk tot groei te brengen in tegenwoordigheid van melkzuurbacteriën, hetgeen zou kunnen liggen aan haar zuurgevoeligheid. Daarnaast kunnen echter ook de individueele eigenschappen der gebruikte stammen van melkzuurstreptococceen een rol spelen; immers de zuurlijnen der verschillende melkzuurbacteriën verlopen niet geheel gelijk (zie VAN BEYNUM <sup>6</sup> ).

Vergelijken we titer en pH van cultures van snelzurende *Str. lactis* en *Str. cremoris*stammen, dan zien we weinig verschil in de eindzuurgraden.

TABEL X. (Aug. 1935).

*Melkzuurstreptococceen geënt in centrifugemelk in geheel gevulde en gesloten stopfleschjes. Titer bepaald na 14 dagen bij 21°.*

Str. cremoris.			Str. lactis.		
N°.	cc n/10 NaOH per 20 g.	pH.	N°.	cc n/10 NaOH per 20 g.	pH.
I	21,7	4,06	10	21,6	4,02
IV	22,2	4,02	15	22,3	4,02
V	22,1	4,03	24	21,8	4,07
R6	20,8	4,07	28	21,6	4,06
R7	21,7	4,03	30	21,5	4,05
R13	22,3	4,01	62	21,6	4,05
18	21,7	4,04			
19	22,7	4,02			

Wij komen dus tot de conclusie, dat de werking der melkzuurbacteriën alleen bestaat uit het op een geschikten zuurgraad brengen van het milieu voor de aromabacteriën. De wijze, waarop ze dit doen, kan van belang zijn (b.v. voor de intensiteit van het aroma), doch bij de snelzurende melkzuurbacteriën is het onderscheid tusschen de verschillende stammen zóó gering,

dat er voorloopig geen goede gronden bestaan hierop een onderscheid te baseeren. Voor zoover wij kunnen zien is dit onderscheid althans niet aan te geven door een verdeeling in *Str. lactis* en *Str. cremoris*. Beide soorten kan men in even goede mate in zuursels toepassen. Beide geven met aromabacteriën, mits deze goed groeien, aroma.

Ook de productie van acetyl-methyl-carbinol door de melkzuurstreptococci schijnt van geen belang te zijn. Men zou zich kunnen indenken, dat, waar acetylmethylcarbinol een optisch actieve verbinding is, het door de melkzuurbacteriën geproduceerde carbinol b.v. het rechtsdraaiende is, terwijl de aromabacteriën alleen den linksdraaienden vorm zouden kunnen benutten. Veel waarschijnlijker is echter — en we hopen hierop in een volgend artikel terug te komen — dat het diacetyl niet door oxydatie van het acetylmethylcarbinol ontstaat. Dit verklaart ook op eenvoudige wijze waarom het door de melkzuurbacteriën gevormde acetyl-methylcarbinol voor de aromavorming van geen belang is.

## VII. VERGELIJKING VAN EEN *STR. LACTIS*- EN *STR. CREMORIS* ZUURSEL.

Voor een vergelijking werden van de gebruikte stammen 2 zuursels samengesteld, één waarvan de melkzuurbacteriën bestonden uit *Str. cremoris*-stammen en het andere uit *Str. lactis*-stammen. Korthedshalve noemen we deze in het vervolg *Str. cremoris*-zuursel en *Str. lactis*-zuursel.

De samenstelling was als volgt:

*Str. cremoris*-zuursel: n°. I, IV, V, R6, R7, R13, R14; a1, a.

*Str. lactis* zuursel: XXIII, 10, 15, 24, 28, 30, 62; a1, a.

Zij werden regelmatig  $2 \times$  per week overgeënt. In de 3 à 4 dagen oude cultures werden bepaald de titer per 10 cc met  $n/10$  NaOH, de pH (electrometrisch) en de hoeveelheid acetylmethylcarbinol + diacetyl, volgens de methode Lemoigne-Van Niel in 30 cc melkcultuur<sup>13)</sup>. De opgegeven getallen geven het gevormde aantal mg nikkeldimethylglyoxim aan. De op deze wijze verkregen resultaten zijn door de steeds gelijke uitvoering der proef zeer zeker vergelijkbaar, al zijn ze dan niet quantitatief.

De hoeveelheid azijnzuur werd bepaald volgens de methode van BEYNUM<sup>15)</sup> in 50 cc cultuur + 50 cc water en 10 cc  $n/1$  H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, terwijl telkens 30 cc werd overgedestilleerd en getitreerd werd met  $n/50$  NaOH. De opgegeven getallen zijn dan ook cc  $n/50$  azijnzuur per 50 cc cultuur. Naderhand werd tevens de groei der aromabacteriën nagegaan door afstrijken op weigelatine.

TABEL XI.

Str. cremoris-zuursel, samengesteld op 12 Januari 1935.						Str. lactis-zuursel, samengesteld op 15 December 1934.					
Datum.	Titer.	pH.	Acetyl- methyl- carbinol.	Azijn- zuur.	Groei der aroma- bacteriën.	Datum.	Titer.	pH.	Acetyl- methyl- carbinol.	Azijn- zuur.	Groei der aroma- bacteriën.
22-1	10,0	4,27				22-1 '35	10,3	4,27			
26-1	10,2	4,13	5,6			26-1	10,3	4,26	10,6		
29-1	11,2	4,08	3,4			29-1	10,6	4,21	10,1		
2-2	11,1	4,08	1,6			1-2	10,7	4,24	11,4		
5-2	10,3	4,16	1,0	15,8	geen	5-2	10,2	4,26	10,9	42,2	
8-2	10,3	4,16	2,0	15,7	geen	8-2	10,3	4,30	10,4	44,2	
11-2	10,6	4,16	2,4	15,7	geen	11-2	10,6	4,27	10,4	44,0	
Str. cremoris-zuursel opnieuw samengesteld						16-2	10,2	4,32	11,0	42,1	
16-2	10,6	4,33	8,4	35,4	goed	19-2	11,2	4,16	8,0	37,7	goed
19-2	11,3	4-17	9,4	32,2	goed	23-2	10,2	4,23	9,8	37,4	goed
23-2	10,4	4,17	6,0	21,5	geen	26-2	10,4	4,19	9,6	38,2	goed
26-2	10,6	4,10	spoor	10,1	geen	1-3 '35	10,7	4,19	11,6	38,4	goed
1-3	9,9	4,23	3,0	14,5	geen	12-3 '36	10,1	4,28	7,6	41,4	goed

We zien reeds na enkele overentingen aan de carbinolbepaling een sterken achteruitgang van het *Str. cremoris*-zuursel, dat daarom opnieuw werd samengesteld; doch weldra zien we aan het vollediger cijfermateriaal nog duidelijker dat dit zuursel snel in kwaliteit achteruitgaat. De aromabacteriën kunnen zich niet handhaven.

Het *Str. lactis*-zuursel is echter op 1-3-'35 nog uitstekend, al is een langzame achteruitgang te bespeuren. Op het moment, waarop we dit schrijven, is het *Str. lactis*-zuursel meer dan een jaar oud, doch nog steeds van goede kwaliteit (zie bepalingen van 12-3-'36). Op 31 Jan. '36 werd de reinheid van dit zuursel gecontroleerd. Onder de eruit geïsoleerde melkzuurstreptococci werden slechts die van het *Str. lactis*-type gevonden. We zien dus aan dit voorbeeld, dat het zuursel samengesteld uit *Str. lactis* en aromabacteriën veel beter voldeed dan het zuursel samengesteld uit *Str. cremoris* en aromabacteriën. Het zij echter verre van ons om te beweren, dat dit altijd zoo zijn zal. Integendeel, wij beschouwen immers *Str. lactis* en *Str. cremoris* als volkomen gelijkwaardig in dit opzicht. De individueele eigenschappen van stam tot stam zullen echter kunnen bepalen of een combinatie meer of minder voldoet. Wij hebben daarom getracht uit te maken welke van de gebruikte *Str. cremoris*-stammen zich niet goed aanpasten bij de gebruikte aromabetacocci. a en al werden daarom gecombineerd, respectievelijk met I, IV, V, R6, R7, R13 en R14. Het resultaat was, dat de aroma-bacteriën het goed volhielden met I,

IV en V, daarentegen met de R-stammen niet. Nu werden de volgende combinaties gemaakt:

- a. I, IV, V + a,
- b. I, IV, V + a1,
- c. R6, R7, R13, R14 + a en
- d. R6, R7, R13, R14 + a1.

Merkwaardigerwijze wilden nu combinaties *a* en *b* het niet goed doen; *c* en *d* hielden het veel langer vol, doch ook hier gaven de aromabacteriën het ten slotte op.

Nu werden alle *Str. cremoris*-stammen apart met *a* en *a1* gecombineerd, dus I + *a*, I + *a1*, IV + *a*, enz.

De combinatie R14 + *a1* en vooral IV + *a1* bleek thans uitstekend te voldoen, terwijl de andere combinaties het spoedig opgaven. In het algemeen gesproken zien we dus een zeer willekeurig gedrag, blijkbaar afhankelijk van zeer kleine verschillen van omstandigheden. Bij dezen stand van zaken kunnen we dan ook aan geen enkele groep der melkzuurstreptococcen bij de aromavorming de voorkeur geven. De eenige eischen zijn, dat ze voldoende snel een voldoende hoogen zuurgraad aan de melk of den room geven en dat zij geen abnormaal onaangename geur hieraan doen toekomen.

### VIII. EENIGE AFWIJKENDE MELKZUURBACTERIËN.

Onder de in de tabellen II en III genoemde melkzuurstreptococcen komen eenige typen voor, welke aan een nader onderzoek zijn onderworpen, omdat zij geheel afwijkend waren van de gewone melkzuurstreptococcen.

*a. Streptococcus aromaticus.* Dit betreft in de eerste plaats de in tabel III genoemde stammen W1, W2, W3 en 14, waarbij aangegeven staat, dat zij in melk een diacetylgeur produceeren. De stammen W1, W2 en W3 waren in 1928 geïsoleerd uit zure wei, afkomstig van een kaasboerderij, en de stam 14 was in 1927 geïsoleerd uit een lunchkaasje. Men vindt deze types meermalen, doch lang niet altijd, in kaas. Zij stremmen melk pas in 5 à 6 dagen, doch na verloop van tijd wordt een tamelijk hoogen zuurgraad bereikt.

TABEL XII. Aug. 1935.

14 dagen in centrifugemelk bij 21° in geheel gevulde en gesloten stopfleschjes.

Stam.	Titer per 10 g.	pH.
W1	10,3	4,23
W2	10,4	4,18
W3	10,8	4,14
14	10,1	4,24

Het zijn korte streptococcen, Gram-positief en katalase-negatief. Waar nu diacetyl geproduceerd wordt, verkeerden we eerst in de meening, dat het aromabetacoccen zouden zijn, die méér zuur vormen dan de ons bekende aromabacteriën, waardoor na eenigen tijd stremming optreedt. Aan den anderen kant zagen wij, dat de eigenschappen veel overeenkomst vertoonden met die van *Str. cremoris*. Een bepaling van den aard van het gevormde melkzuur moest hier uitsluitsel geven. Volgens ORLA JENSEN's indeeling toch vormen de streptococcen d-melkzuur, de betacoccen l-melkzuur.

De stammen werden hiertoe gedurende 1 maand bij 21° gekweekt in 1½ l centrifugemelk, waaraan 15 g krijt als steriele suspensie na het steriliseeren der melk was toegevoegd. Bij de verwerking werd aan de cultuur 130 cc n/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> toegevoegd en ± 45 min. in een kokend waterbad verwarmd, totdat de wei zich afgescheiden had. Na filtratie werd het residu nogmaals met water uitgetrokken, welk extract bij het eerste filtraat gevoegd werd. Dit filtraat werd thans tot bijna droog ingedampt en vervolgens in een mortier aangewreven met anhydrisch natriumsulfaat, waardoor een droog poeder werd verkregen. Dit werd in een Soxhletapparaat 14 dagen uitgetrokken met droge aether. Van het aetherisch extract werd de aether afgedampt en het residu opgenomen in water. Na ontkleuring met noriet werd ZnCO<sub>3</sub> toegevoegd, afgefiltreerd en ingedampt tot het Zn-lactaat begon uit te kristalliseeren. Na een dag staan werd afgezogen en het verkregen neerslag omgekristalliseerd. Op deze wijze kon 5 à 6 g Zn-lactaat verkregen worden. Van een zoo geconcentreerd mogelijke oplossing werd de draaiing bepaald in een buis van 5 dm lengte. Het zinkzout van het d-melkzuur draait links en van het l-melkzuur rechts.

Vervolgens werd het kristalwatergehalte bepaald door drogen bij 105°. Van het actieve zout bedraagt dit 12,9 %, van het inactieve 18,2 %. Ten slotte werd door gloeien het gehalte aan ZnO bepaald. Voor zuiver kristalwatervrij zinklactaat bedraagt dit 33,42 %.

We vonden nu het volgende.

TABEL XIII.

Stam n°.	Draaiing Zn-zout.	Kristalwater- gehalte in %.	ZnO-gehalte in %.
W1	links	12,91	33,48
W2	links	12,80	33,32
W3	links	12,91	33,44
14	links	12,88	33,46

Deze stammen vormen dus zuiver d-melkzuur. Zij behooren in den zin van ORLA JENSEN tot de groep *Streptococcus*. Zij bleken geen citroenzuur

om te zetten en slechts sporen vluchtig zuur te vormen. Echter acetylmethylcarbinol en diacetyl ontstaan wel. Zoo vormde b.v. W1 in melk per l: 74 mg azijnzuur, 70 mg acetylmethylcarbinol \*) en 6,6 mg diacetyl \*), terwijl van de 1770 mg citroenzuur 1 aq. slechts 40 mg niet werd teruggevonden.

Een mengcultuur van een *Str. lactis* en een *aromabetacoccus* (15 + a1; met opzet werd n°. 15 gekozen, aangezien deze zelf geen carbinol in melk vormt) zette in deze zelfde melk al het citroenzuur om (1770 mg) onder vorming van 917 mg azijnzuur, 195 mg acetylmethylcarbinol en 6 mg diacetyl.

Het diacetyl en carbinol moeten deze stammen dus uit de suiker produceeren en het mechanisme van deze productie zal dus geheel anders zijn dan bij de aromabacteriën. Zij stellen zeer hoge eischen aan hun stikstofvoeding en deze veeleischendheid nam in den loop der jaren toe. Aanvankelijk gelukte het nog wel om in een milieu met Pepton Poulenc als stikstofbron goeden groei te krijgen. Later ging dat niet meer, ook niet indien de pH van 5,5—7 gevarieerd werd (Gekweekt werd bij pH 5,50, 5,90, 6,17, 6,35, 6,51, 6,66 en 6,91). Gistautolysaat noch caseïnepepton bleken te voldoen. In melk groeien zij evenwel zeer goed. Toevoeging van een weinig gistautolysaat doet de cultuur in 2 dagen stremmen. Dit gebeurt eveneens bij kweeking bij 30°, waarbij echter een onaangename, prikkelende geur aan de cultures komt en de diacetylgeur niet meer duidelijk is. Bij 40° treedt geen groei in melk meer op. Op vaste voedingsmedia is de groei slecht; ook hier werkt gistautolysaat groei-versnellend.

De suikervergisting werd bepaald in vleeschbouillon met 1% suiker. De uit lunchkaas geïsoleerde stam l 4 vergiste zelfs op deze wijze geen enkele suiker, zoodat de waarde van de hier gegeven gistingmogelijkheid ongetwijfeld niet groot is. Immers de vergistingsmogelijkheid van een bacterie is in hooge mate afhankelijk van de geschiktheid van het N-voedsel. We zijn er echter niet in geslaagd een beter milieu dan vleeschbouillon te vinden.

Op deze wijze onderzocht, werd geen zuur gevormd uit: galactose, laevulose,

TABEL XIV. Febr. 1935.

*Vleeschbouillon + 1% suiker.*  
*Gevormd melkzuur in grammen per liter.*

Uit	Na dagen.	W1.	W2.	W3.
Glucose . . . . .	8	3,3	3,3	3,1
	15	3,4	3,5	3,7
Lactose . . . . .	7	2,3	3,1	2,8
	15	3,3	3,7	3,2
Mannose . . . . .	7	1,5	1,4	1,3
	14	1,6	—	1,4

\*) Hier werkelijk berekend, dus niet de nikkelzouten.

maltose, saccharose, raffinose, rhamnose, arabinose, xylose, inuline, salicine, dextrine, zetmeel, glycerine en manniet.

Welk belang is er nu bij het aromavraagstuk aan deze bacteriën verbonden, waar zij toch door hun te langen stremtijd voor de praktische boterbereiding niet geschikt zijn? Wij hebben n.l. nooit snelzurende bacteriën van dit type kunnen vinden.

Uit theoretisch oogpunt kunnen zij ons een aanwijzing geven over de samenstelling van den typischen boteraromageur. Algemeen bekend is, dat diacetyl het hoofdbestanddeel hiervan is, maar de geur van zure melk, waaraan diacetyl is toegevoegd, wijkt belangrijk van het boteraroma af. De daarbij geproduceerde geur komt juist overeen met de geur der melkcultures van bovengenoemde bacteriesoort.

Welk verschil bestaat er nu tusschen deze cultures en een goed zuursel? Doordat het citroenzuur niet omgezet wordt, wordt geen vluchtig zuur geproduceerd, dus geen CO<sub>2</sub> en geen azijnzuur. Voegt men nu iets azijnzuur en bicarbonaat toe aan de cultures, dan wordt inderdaad de diacetylgeur veranderd in het typische zuurselaroma. Het gelukte ons ook geheel synthetisch het boterzuurselaroma na te bootsen door aan 30 cc centrifugemelk toe te voegen: 1,8 cc n/1 melkzuur, 2 cc 1 %-ige acetylmethylcarbinoloplossing, 1 cc 3<sup>3</sup>/<sub>4</sub> %-ige azijnzuuroplossing, 1 cc 6 %-ige kaliumbicarbonaatoplossing en  $\frac{1}{2}$  cc 0,15 %-ige diacetyloplossing. De diacetyloplossing moet hierbij versch bereid zijn uit versch gedestilleerd diacetyl.

Vermoedelijk bestaat het boteraroma dus uit den geur van diacetyl en azijnzuur, verfrist door CO<sub>2</sub>. Sporen van andere vluchtige verbindingen oefenen mogelijk nog invloed uit. Zoo ruikt men, vooral bij sterke luchttoetreding, dikwijls een typischen vanillegeur. Het is echter ongetwijfeld het diacetyl, dat aan het zuursel zijn kenmerkenden aromatischen geur geeft.

Het valt niet te ontkennen, dat de hier besproken stammen eigenschappen bezitten, welke het ook in systematisch opzicht wenschelijk maken van een aparte groep te spreken.

Naast een zeer bijzondere kieskeurigheid voor hun stikstofvoedsel worden zoo weinig koolhydraten vergist, dat ze zich van alle andere melkzuurstreptococcen onderscheiden. Waar ze in ORLA JENSEN's schema behooren tot de Streptococcen, aangezien ze d-melkzuur vormen en één der karakteristieke eigenschappen het in melk produceeren van een aromatischen geur is, lijkt ons de naam *Streptococcus aromaticus* zeer toepasselijk.

b. *Streptococcus citrophilus*. Een tweede afwijkende bacteriesoort is in tabel II vertegenwoordigd door de stammen n°. 21 en n°. 60, welke uit spontaan gezuurde handelsmelk werden geïsoleerd. We zagen, dat deze soort een typische



*Str. lactis* was. Bijzonder opvallend was echter de hooge productie van acetylmethyl-carbinol in melk. Allereerst werd nu nagegaan of inderdaad d-melkzuur gevormd werd. Dit bleek het geval te zijn; het Zn-zout van beide vertoonde een linksche draaiing, het kristalwatergehalte bedroeg voor n°. 21: 12,69 % en voor n°. 60: 12,96 %; het ZnO-gehalte voor beide 33,46 %. Voor het verder onderzoek werd alleen de stam n°. 21 gebezigd. De vergisting der verschillende suikers werd nagegaan met als stikstofbron pepton Poulenc, caseïnepepton, gistautolysaat en vleeschbouillon. De resultaten waren in al deze bodems analoog. De monosacchariden wrden goed vergist, terwijl van de disacchariden maltose en lactose goed, daarentegen saccharose zwak werd vergist, terwijl ook dextrine vergist werd, zoodat de bacterie zich, wat de vergisting betreft, geheel bij *Str. lactis* aansluit. In den loop van het onderzoek bleek, dat deze bacterie in staat is zeer snel het in melk aanwezige citroenzuur om te zetten. Om deze reden stellen wij den naam *Streptococcus citrophilus* voor.

Bij de omzetting van het citroenzuur vormt *Streptococcus citrophilus* in melk nu op geheel dezelfde wijze azijnzuur, CO<sub>2</sub>, acetylmethyl-carbinol en diacetyl als een combinatie van een aromabetaococcus en een snelzurende streptococcus.

Ter vergelijking werden 2 kolven met 750 cc centrifugemelk geënt met de combinatie 15 + a1 en met 21. Met opzet werd stam 15 gekozen, daar deze zelf in melk geen acetylmethylcarbinol vormt. Na 4 dagen bij 21° werd bepaald:

- a. de pH, electrometrisch met de chinhydronelectrode;
- b. de titer per 10 g, door titratie met n/10 HaOH en phenolphthaleïne als indicator;
- c. de hoeveelheid gevormd acetylmethylcarbinol, volgens de methode Lemoigne-van Niel;
- d. de hoeveelheid gevormd diacetyl volgens dezelfde methode, waarbij gedestilleerd werd in CO<sub>2</sub>-stroom om luchttoxydatie te verhinderen;
- e. de hoeveelheid azijnzuur, volgens de methode van VAN BEYNUM;
- f. de hoeveelheid citroenzuur (berekend op citroenzuur + 1 mol. aq.) volgens de door VAN BEYNUM <sup>6)</sup> verbeterde methode van KUNZ;
- g. de al of niet aanwezigheid van butyleenglycol, volgens de methode van KLUYVER, DONKER en VISSER 't HOOFT <sup>16)</sup>;
- h. titer, pH, azijnzuur en citroenzuurgehalte van de oorspronkelijke melk.

Van de bepaling van de hoeveelheid CO<sub>2</sub> werd om experimenteele redenen bij deze proef afgezien. Doch ook dit wordt in dezelfde hoeveelheid gevormd, zooals in andere proeven bepaald werd.

TABEL XV. Nov. 1935.

	Serie I. 750 cc centrifugemelk, geënt met 5 cc cultuur.			Serie II. 750 cc centrifugemelk, geënt met 7½ cc cultuur.		
	Blanco.	15 + a1.	21.	Blanco.	15 + a1.	21.
pH . . . . .	6,20	4,18	4,32	—	4,19	4,30
Titer per 10 g . . . .	2,3	12,3	11,1	—	11,6	10,9
a.m.c. in mg per l . .	0	157	150	—	195	198
Diacetyl in mg per l	—	—	—	—	6,0	7,7
Aziijnzuur in mg per l	97	976	997	101	1018	1025
Citroenzuur in mg per l	1830	0	0	1770	0	0
Butyleenglycol . . . .	0	spoor	spoor	—	spoor	spoor

We zien dus een dusdanige overeenkomst, dat we ons er slechts over verbazen kunnen, dat een melkcultuur van *Streptococcus citrophilus* niet aromatisch riekt. Dit is echter niet het geval. De geur is onaangenaam wrang. Cultiveert men echter in zeer dunne lagen, dan treedt dikwijls een op zuursel-  
aroma gelijkende geur op, hetzij door de nog hoogere diacetylproductie, hetzij door het verdwijnen van den onaangenaamen geur.

Wij hebben dus hier een melkzuurstreptococcus, die als het ware de eigenschappen van de combinatie van *Streptococcus lactis* of *-cremoris* en *Beta-coccus cremoris* in zich vereenigt en daarbij, wat zeer belangrijk is, uitstekend groeit in synthetische media. De aromabacteriën doen dit uiterst slecht, ja zelfs in melk slaan zij, zooals we gezien hebben bij het vormen van een combinatie, veelal niet aan of worden op den achtergrond gedrongen. Ongetwijfeld zijn vele in de literatuur vermelde onverklaarbare uitkomsten te wijten aan het feit, dat de aromabacteriën niet of niet voldoende tot hun recht zijn gekomen. Groeicontrôle is daarom beslist noodzakelijk. Wij behelpen ons door bij onze proeven steeds uit te gaan van stammen met zeer goed bekenden kolonievorm, welke methode zeer doeltreffend is, doch waarbij men ten slotte niet een groot aantal mislukkingen voorkomt bij gebruik van synthetische media, omdat de aromabacteriën het hierin veelal niet doen.

Door het gebruik van *Streptococcus citrophilus* wordt deze moeilijkheid ondervangen. Vooropgesteld, dat deze bacterie inderdaad het citroenzuur op dezelfde wijze omzet als een zuursel, en hiervoor is gezien de resultaten van tabel XV alle redenen, dan kunnen wij met behulp van deze bacterie waarschijnlijk sneller en beter tot een inzicht komen omtrent het chemisme van de omzetting van het citroenzuur.

Dat inderdaad citroenzuur de bron is waaruit *Str. citrophilus* aziijnzuur en acetylmethylcarbinol vormt, kan men zeer gemakkelijk aantoonen door te kweken in pepton Poulenc, zonder en met toevoeging van natriumcitraat. Slechts bij toevoeging van citraat ontstaan de genoemde producten.

## SAMENVATTING.

Volgens de tegenwoordige opvattingen ontstaat het boteraroma door samenwerking der melkzuurstreptococcen en betacoccen (aroma-bacteriën), waarbij uit het citroenzuur, dat voor  $\pm 0,2\%$  in melk aanwezig is, het hoofdbestanddeel van het aroma, het diacetyl, gevormd wordt en als nevenproducten  $\text{CO}_2$ , azijnzuur en acetylmethylcarbinol, uit welke laatste verbinding het diacetyl door oxydatie zou ontstaan.

De functie, welke de melkzuurbacteriën in dit vormingsproces bekleeden, kan nu volgens onderzoekingen van VAN BEYNUM en van HAMMER overgenomen worden door organische en anorganische zuren, m.a.w. de beteekenis der melkzuurbacteriën zou alleen berusten op de vorming van een milieu met geschikten zuurgraad. Daartegenover staat, dat in de zuivelwereld en vooral in Denemarken de voorkeur wordt gegeven aan *Str. cremoris* als melkzuurbacterie boven *Str. lactis*, omdat eerstgenoemde zich speciaal zou eigenen tot het verkrijgen van een goede combinatie met de aromabetacoccen. Volgens sommige schrijvers zou de reden hiervan zijn, dat *Str. cremoris* acetylmethylcarbinol vormt in melk en *Str. lactis* niet. Zelfs treft men in de literatuur uitlatingen aan, welke erop wijzen, dat men in de meening verkeert, dat *Str. cremoris* zonder medewerking der betacoccen tot aromavorming in staat is. Aan de hand van de literatuur werd aangetoond, dat dit niet juist is en werd nagegaan wat men onder *Str. cremoris* heeft te verstaan.

63 stammen van melkzuurbacteriën, welke meerendeels afkomstig waren uit zuursels, spontaan gezuurde melk, wei en kaas, werden onderzocht. Nagegaan werd de stremtijd, het aantal coccen per ketting, de acetylmethylcarbinolreactie en de vergisting van maltose en dextrine. De tabellen I, II en III geven de resultaten weer respectievelijk van de stammen, geïsoleerd uit zuursels, van die uit spontaan gezuurde melk en van die van andere herkomst. Volgens het schema van ORLA JENSEN werden alleen de maltose- en dextrinevergisters als *Str. lactis* en de andere als *Str. cremoris* beschouwd. In tabel IV vindt men vergeleken de acetylmethylcarbinolreactie van de verschillende stammen in deze 2 groepen. Er bleek duidelijk, dat er geen sprake was, dat *Str. cremoris* acetylmethylcarbinol vormt, in tegenstelling tot *Str. lactis*. Er zijn dus ook *Str. lactis*-stammen, welke acetylmethylcarbinol vormen.

De vraag werd nu onder de oogen gezien of er zich onder de gebruikte stammen een aantal bevonden, die bijzonder geneigd waren met aroma-bacteriën aroma te vormen. Uit practische overwegingen kwamen alleen de snelzurende streptococcen hiervoor in aanmerking, terwijl zij ook geen afwijkenden geur mochten bezitten. De gebruikte 26 stammen werden ge-

combineerd met 7 in onze verzameling aanwezige aromabacteriën, welke uit verschillende zuursels geïsoleerd waren. Op deze wijze ontstonden 182 combinaties, waarmede ruikproeven werden uitgevoerd.

Aanvankelijk bleek het optreden van aroma tamelijk willekeurig (tabel VI). Nadat echter vastgesteld was, dat veelal de aromabacteriën in een combinatie niet of niet voldoende tot ontwikkeling kwamen, werden de proeven herhaald met een controle van den groei. Thans bleek (tabel IX), dat de aromabacteriën in staat waren met alle gebruikte stammen aroma te geven. Een absolute vereischte is, dat de aromabacteriën goed groeien. Men kan dezen groei dikwijls stimuleeren door bij het vormen der combinaties de aroma-bacteriën 16 uur eerder, of in grootere hoeveelheid dan de melkzuurbacteriën, te enten of een druppel gistautolysaat toe te voegen.

Duidelijk bleek, dat er geen aanleiding bestaat om aan *Str. cremoris* bij het aromavormingsproces de voorkeur te geven boven *Str. lactis*. De beteekenis der melkzuurstreptococceen ligt in de vorming van een geschikten zuurgraad. Het is dus logisch, dat zij door melkzuur of andere zuren kunnen worden vervangen. Toch zal de wijze, waarop het milieu zuur wordt, van invloed kunnen zijn, hetgeen verklaarbaar maakt, dat van stam tot stam geringe verschillen kunnen optreden, die bij sommige combinaties leiden tot een moeilijk aanslaan der aromabacteriën.

Ook de eigenschap der melkzuurbacteriën om al of niet acetylmethylcarbinol te vormen bleek een factor, die in geen enkel verband stond met de aromavorming. Dit steunt in sterke mate onze opvatting, dat het diacetyl niet door oxydatie van het acetylmethylcarbinol ontstaat.

Voor vergelijking werden twee zuursels samengesteld door het combineeren van 2 aromabetacocceen eensdeels met 7 *Str. cremoris*-stammen en anderdeels met 7 *Str. lactis*-stammen. Het laatste was na 1½ jaar nog uitstekend. Bij isolatie der erin aanwezige melkzuurbacteriënstammen bleken dit alle *Str. lactis*-stammen te zijn, zoodat er in dat tijdsverloop geen infectie plaats gevonden had.

Het *Str. cremoris*-zuursel (tabel XI) ging echter snel in aroma-vormend vermogen achteruit, daar de aromabetacocceen zich niet handhaven konden. We willen hier niet de conclusie aan verbinden, dat *Str. lactis* beter geschikt is voor zuursels dan *Str. cremoris*, daar het resultaat bij andere aromabacteriën wel anders zijn kan, doch wij zien ook geen enkele reden om aan *Str. cremoris* de voorkeur te geven.

Ten slotte werden eenige afwijkende melkzuurstreptococceen beschreven. *Streptococcus aromaticus*, waarvan wij enkele stammen uit kaas en wei isoleerden vormt d-melkzuur, laat het citroenzuur der melk onaangetast, vormt geen azijnzuur en CO<sub>2</sub> maar wel acetylmethylcarbinol en diacetyl. Het type zuurt

melk slechts langzaam en is voor de practische boterbereiding daarom niet van belang. Aan zijn stikstofvoedsel stelt hij opmerkelijk hooge eischen. Bij gebruik van andere media dan melk, zooals gistautolysaat, caseïne-pepton of pepton Poulenc met glucose en voedingszouten treedt geen groei op. De vergisting der verschillende suikers werd nagegaan in vleeschbouillon met 1 % suiker. Vergist werden alleen glucose, lactose en mannose.

Door hun diacetylproductie bezitten de melkcultures van deze bacterie een aromatischen geur, welke echter afwijkt van het boteraroma. Door toevoeging van azijnzuur en bicarbonaat kon de boteraromageur nagebootst worden.

*Streptococcus citrophilus*, uit handelsmelk geïsoleerd, lijkt in zijn eigenschappen precies op *Str. lactis*. Hij zet echter krachtig citroenzuur om, onder vorming van even groote hoeveelheden azijnzuur, acetylmethylcarbinol en diacetyl, als de combinatie van een melkzuurstreptococcus en betacoccus in melk (tabel XV), terwijl ook CO<sub>2</sub> gevormd wordt. Hij vereenigt dus de eigenschappen van een combinatie in één, geeft echter aan melk en room geen aromageur, doch een wrangen geur, welke aan deze bacterie eigen is.

Aangetoond werd, dat *Str. citrophilus* azijnzuur en acetylmethylcarbinol uit citroenzuur vormt.

#### SUMMARY.

##### **The part of the lactic acid streptococci in the formation of aroma in starters.**

As generally assumed at present the butter aroma is formed from the citric acid of the milk by the simultaneous action of lactic streptococci and aromabetacocci. The main constituent of the typical aroma is diacetyl. Other products of the fermentation in a starter are carbonic acid, acetic acid and acetoïn. From the latter diacetyl may be formed by oxydation.

According to the work of VAN BEYNUM and of HAMMER the action of the lactic acid bacteria can be substituted by organic and inorganic acids; this means that the action of these bacteria only consists of the formation of acid, needed for the production of aroma by the aroma bacteria. On the contrary (and especially in Denmark) a certain kind of lactic acid bacterium, *Streptococcus cremoris*, often is preferred in starters, as it is supposed that the aroma bacteria produce a better aroma with it than with *Streptococcus lactis*. According to some authors this is because of the production of acetoïn by *Str. cremoris*. Some believe that *Str. cremoris* alone can produce the starter aroma. However this is not so. The species *Str. cremoris* derives from STORCH'S

bacterium n°. 18 and STORCH himself denied the aroma production of this strain after his discovery of the X (= aroma) bacteria.

We studied 63 strains of lactic acid streptococci, isolated from starters, spontaneously soured milk, whey and cheese. Time of curdling at 21° C, number of cocci per chain, acetoïn production and the fermentation of maltose and dextrin were determined. Table I shows these data for the lactic acid streptococci of starters, table II for those isolated from spontaneously soured milk and table III for the rest of them. Only the maltose- and dextrin-fermenting cultures were considered as *Str. lactis*, according to ORLA JENSEN's system. As is seen the majority of the bacteria from starters were of the type *Str. cremoris*. Table IV shows the production of acetoïn by the various strains in both groups. Not only *Str. cremoris* forms acetoïn in milk but there are a number of strains of *Str. lactis*, which also are acetoïn-positive. The 26 best strains (time of curdling 1 or 2 days at 21° C., when inoculating 4 mg per 30 cm<sup>3</sup>) were combined with 7 strains of aromabetacocci. Of the 182 mixed cultures the odour was observed on subsequent days by three persons to determine whether aroma formation had occurred. From table VI we see that not all mixed cultures showed aroma, but that the cultures without aroma are spread irregularly over the whole table. It appeared that the absence of aroma in these cultures was due to the fact that the aroma bacteria had not developed. When the aromabetacocci developed aroma always could be observed. The aroma-negative combinations could be forced to produce aroma in milk after transferring from mixed cultures in which the growth of the aroma bacteria was stimulated by inoculating them some 16 hours before the lactic acid bacteria or in greater quantity than the lactic acid bacteria or by adding a drop of yeast autolysate.

As to the aroma production the *Str. cremoris* strains could not be preferred. Mixed cultures with *Str. lactis* also could produce a good aroma, as might be expected because the lactic acid bacteria can be substituted by lactic acid or other acids. Perhaps the rate of acid formation which is different for the various strains of lactic acid bacteria may be of influence on the rate of growth of the aroma bacteria.

The ability of acetoïn production in the group of lactic streptococci has no effect on the aroma of a mixed culture. Mixed cultures with lactic streptococci, not forming acetoïn, could produce as good an odour as those with acetoïn-positive lactic acid streptococci. This suggests that it is probably not acetoïn from which diacetyl is formed. Experimentally we could prove that a starter consisting of aroma bacteria and strains of *Str. lactis* may be of as good a quality as one composed of aroma bacteria and *Str. cremoris*. After making transfers of it in milk every three or four days the quality of

this *Str. lactis* starter was still very good after 1½ year. A starter made of aromabetacocci and *Str. cremoris* strains lost its aroma bacteria after a short time. This does not prove that *Str. lactis* is a better starter organism than *Str. cremoris*, as another result might have been obtained with other strains of aromabetacocci, but it proves clearly that there is no reason to prefer *Str. cremoris* above *Str. lactis*.

A description was given of two hitherto unknown species of lactic acid bacteria.

*Streptococcus aromaticus*, found in cheese and whey, produces dextrarotatory lactic acid and does not attack citric acid. In milk it forms no acetic and carbonic acid. Small amounts of acetoin and diacetyl are products of the fermentation. It is a slow acid former and curdles the milk only after 5 days or more at 21° C. It thrives well in milk and whey, but the nitrogenous food of peptone or yeast-autolysate does not meet the requirements of this bacterium. The fermentation of carbohydrates could be determined in beef broth medium. Only dextrose, lactose and mannose were fermented. As diacetyl is produced the milk cultures of this organism possess an aromatic odour, not quite the same as that of a good starter. The odour of milk cultures perfectly resembles that of a starter when small amounts of acetic acid and hydrocarbonate are added.

*Streptococcus citrophilus*, a diplococcus isolated from market milk, is very much like *Str. lactis*. It acidifies milk within a short time, forms dextrorotatory lactic acid and ferments maltose and dextrin. However it vigorously ferments citric acid and produces from it acetic acid, carbonic acid, acetoin and diacetyl. The quantities of acetic acid, acetoin and diacetyl are just the same as in a starter (tabel XV). This organism combines the properties of a mixed culture of lactic streptococci and aromabetacocci. It does not smell like a starter but a milk culture of it has the disagreeable acrid odour as a pure culture of so many lactic acid streptococci. Only when growing in thin layers with free access of air an aromatic odour (diacetyl) can be observed. \*)

---

\*) When this article was already on the press we received a publication of T. MATUSZEWSKI, E. PYANOWSKI and J. SUPINSKA, *Streptococcus diacetylactis* n. sp. and its application to the buttermaking, *Travaux et Comptes rendues de l'Institut de Bactériologie, etc. à Varsovie*, XXI, 1936, in which a lactic acid bacterium is described, resembling very much our type *Str. citrophilus*.

- 1) Zie voor historisch overzicht o.a. S. KNUDSEN, *Starters, Journ. of dairy research*, 2, 137 (1931).
- 2) F. W. J. BOEKHOUT en J. J. OTT DE VRIES, Aromavormers bij de roomzuring, *Versl. v. landbk. onderz.*, 24, 1 (1920); *Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1917*, blz. 48.  
V. STORCH, Fortsaatte Undersøgelser over Fremstillingen af Syrevaekkere, *102de Beretning fra Forsøgslab.* (1919).  
B. W. HAMMER and D. E. BAILY, The volatil acid production of starters and organisms isolated from them, *Agr. Exp. Stat. Iowa St. Coll. of Agric. and Mech. Arts, Res. Bull.* N°. 55, Sept. 1919.
- 3) S. ORLA JENSEN, *The lactic acid bacteria*, Kopenhagen, 1919.
- 4) F. W. J. BOEKHOUT en J. VAN BEYNUM, Aromabacteriën en botergebreken, *Versl. v. landbk. onderz.*, 32, 415 (1927); *Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1926*, blz. 266.
- 5) *Bioch. Zeitschr.*, 210, 234 (1929).
- 6) J. VAN BEYNUM, Aromavorming door boteraromabacteriën, *Versl. v. landbk. onderz.*, 40 C, 355 (1934); *Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1933*, blz. 65.
- 7) *Agr. Exp. Stat. Iowa St. Coll. of Agric. and Mech. Arts, Res. Bull.* N°. 63, 65 (1920), 66, 67 (1921), 80, 81 (1923), 106 (1928), 146 (1931), 155 (1933), 179 (1935).
- 8) *Zentr. bl. f. Bakt.*, II, 86, 6 (1932).
- 9) S. ORLA JENSEN, *The lactic acid bacteria*, 1919, pg. 54.
- 10) V. STORCH, Nogle Undersøgelser over Flødens Syring, *18de Beretning fra Forsøgslab.* (1890).
- 11) *Zentr. bl. f. Bakt.* II, 29, 610 (1911).
- 12) S. ORLA JENSEN, A. D. ORLA JENSEN, B. SPUR, *Le Lait*, 6, 161 (1926).
- 13) *Bioch. Zeitschr.*, 187, 472 (1927).
- 14) J. VAN BEYNUM, Aromavorming door boteraromabacteriën, *Versl. v. landbk. onderz.*, 40 C, 355 (1934) blz. 381 en 382.
- 15) J. VAN BEYNUM, De bepaling van vluchtige vetzuren volgens de destillatiemethode, *Versl. v. landbk. onderz.*, 39 C, 57 (1933); *Jaarverslag Proefzuivelboerderij over 1932*, blz. 33.
- 16) *Bioch. Zeitschr.*, 161, 361 (1925).