

55
NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE
MEIERIINSTITUTTET

ferdigst innar
10.9.

SYRNINGSTEKNIKK

VED

A. H. STRAND

ÅS-NLH, 1974

NORGES LANDBRUKSHØGSKOLE
MEIERIINSTITUTTET

SYRNINGSTEKNIKK

VED

A. H. STRAND

ÅS-NLH, 1974

INNHOLD.

	Side
1. INNLEDNING.....	3
2. HISTORIKK	4
3. KULTUREN.....	6
3.1. <u>Mikroorganismene</u>	6
3.1.1. Streptococcus	6
3.1.2. Pediococcus	11
3.1.3. Leuconostoc	12
3.2. <u>Kulturmaterialiet</u>	17
3.2.1. Flytende kulturer	17
3.2.2. Tørrpreparater	18
3.2.3. Konsentrerte kulturer	18
3.3. <u>Stoffomsetningen i syrekulturen</u>	19
3.3.1. Energioverføringen ved adenosinfosfat	21
3.3.2. Sukkerforgjæring	22
3.3.2.1. Embden - Meyerhof - gjæringsskjema.....	22
3.3.2.2. Heterofermentativ gjæring.....	26
3.3.2.3. Pyrodruesyrens muligheter i stoffomsetningen	30
3.3.3. Citronsyregjæringen	31
3.3.4. C- 4 - forbindelsene	33
3.3.5. Kulturens CO ₂ -produksjon	42
<i>NB!</i> 3.4. <u>Variasjoner i kulturens egenskaper</u>	45
3.4.1. Genetisk betingete variasjonsårsaker.....	47
3.4.1.1. Bakteriofager	47
3.4.2. Miljømessig betingete endringer i kulturen	53
3.4.2.1. Syremelken	53
3.4.2.1.2. Vekstfaktorer	53
3.4.2.1.2. Hemningsstoffer	56
3.4.2.1.2.1. Melkens bakteriehemnende egenskaper...	57
3.4.2.1.2.2. Hemningsstoffer produsert av melkens mikroflora.....	59
3.4.2.1.2.3. Hemningsstoffer som kan tilføres melken	60
3.4.2.1.3. Faktorer av betydning for valg av syremelk.....	62

	Side
4. PRODUKSJONSUTSTYR OG FREMSTILLING.....	65
4.1. <u>Modersyre</u>	68
4.1.1. Tilberedning og varmebehandling av syremelk. Utstyr og praksis.....	68
4.1.1.1. Autoklavering.....	69
4.1.1.2. Kokende vannbad	70
4.1.2. Effekter av syremelkens varmebehandling..	71
4.1.3. Poding og inkubasjon. Utstyr og praksis..	75
4.1.4. Effekter av poding og inkubasjon	78
4.1.5. Lagring av kulturer på meieriene.....	84
4.2. <u>Brukssyre. Utstyr og praksis</u>	87
4.3. <u>Rom for syrelaging</u>	90
5. <u>NB!</u> KONTROLL AV SYREVEKKERE	94
5.1. <u>Organoleptiske bedømmelser</u>	94
5.1.1. Utseende.....	95
5.1.2. Konsistens	95
5.1.3. Lukt og smak	96
5.1.4. Oversikt over organoleptiske anmerkninger	99
5.2. <u>Kjemisk-fysikalske prøver</u>	100
5.2.1. Kontroll av surheten	101
5.2.2. Kreatinprøven.....	101
5.2.3. Acetaldehydprøven.....	103
5.2.4. Kulturens CO ₂ -innhold.....	104
5.2.5. Kontroll av citrat-omsetningen.....	105
5.2.6. Konsistensmåling-viskositet-fasthet.....	106
5.3. <u>Mikrobiologisk kontroll</u>	107
5.3.1. Totaltallet.....	107
5.3.2. Citratforgjærere.....	107
5.3.3. Differensiering mellom S.lactis og S.cremoris	108
5.3.4. Mugg og gjær	108
5.3.5. Coliforme og fremmede organismer.....	108
5.3.6. Lactobasiller.....	108
5.3.7. Påvisning av maltaromadannere.....	108
5.3.8. Klarlegging av årsaker til syrningssvikt.	108

1. INNLEDNING.

Ved fremstilling av de fermenterte meieriprodukter nyttes som kjent i stor utstrekning renkulturer av forskjellige mikroorganismer. Med fermenterte produkter menes her produkter som har gjennomgått en eller annen gjæringsprosess, hvor viktige melkekomponenter undergår enzymatiske omdannelser.

Fysiologiske forskjeller hos de anvendte mikroorganismer resulterer ofte i forskjellige stoffskifte-produkter som igjen gir produktene sin karakteristiske smak og aroma.

Hos de samme typer av mikroorganismer kan forskjellige stammer og artsvarianter føre til endrede smaksnyanser på produktene. For å kunne lage fermenterte produkter med konstante smaks-kvaliteter (noe som er svært viktig med dagens merkevarer) kreves at en kan opprettholde maksimal stabilitet i de kulturer som anvendes. På den andre siden kan systematisk seleksjon av varianter i kulturene gi muligheter for utvikling av nye produkt-typer med nye og andre produktkvaliteter.

Melkesyregjæringen er den viktigste fermenteringsprosess man har i meieriindustrien. Denne utnyttes systematisk i en rekke produkter.

For enkelte produkter ønskes en mest mulig ren melkesyregjæring, mens en for andre produkter gjerne vil ha en kultur som også gir andre stoffskifte-produkter f.eks. mye CO_2 (hulldannelse i ost) eller mer utpregete smaks-komponenter, som f.eks. diacetyl (i smør) eller acetaldehyd (i yoghurt). For ikke å operere med alt for mange forskjellige kulturer i meieriet har man kommet frem til syrevekkere som i én kultur ofte nyttes både til smør, kulturmelk og til ysting. (Til forskjellige spesialprodukter er imidlertid en slik kultur ikke anvendelig).

I syrningsteknikken vil en forsøke å belyse de faktorer som er av størst viktighet med hensyn til valg av syrekultur og for å oppnå en maksimal stabilitet på den anvendte kulturen under de praktiske forhold en har i meieriet.

2. HISTORIKK.

Den kombinerte meieri-syrevekkeren er frukten av en intens forskningsinnsats gjennom flere år-tier. Det hele startet med at dansken Storch oppdaget at renkulturer av visse melkesyrebakterier ga gode resultater ved syrning av fløte og at særlig enkelte stammer av disse ga en fyldig aromatisk lukt og smak på smøret. Dette var i 1890. Det ble nå en enorm interesse for studiet av disse kulturer hvis egenskaper man enda kjente lite til og forskningen på syrningskulturene tok særlig stor fart i Danmark, Nederland og USA. Forskere fra disse land kom da også praktisk talt samtidig frem til at en vellykket syrekultur måtte bestå av to prinsippielt forskjellige bakterier, én type som var ansvarlig for syredannelsen og en annen som var ansvarlig for aromaproduksjonen i kulturen. Dette var i 1919. Det tok altså nære 30 års forskning før man kom frem til denne erkjennelse.

Den neste store oppdagelse på området kom et lite ti-år senere, da van Niel, samtidig med andre forskere, i 1928 fant at selve aromastoffet var diketonen diacetyl.

Alt etter hvilke forskere som beskrev de bakterier de fant i syrekulturen ble ^{disse} gitt forskjellige navn, og systematikken ble derfor til å begynne med temmelig forvirrende.

Først i førtiårene begynte en å få en mer avklaret oversikt over de forskjellige melkesyrebakterier, og den senere tids forskning på området har særlig gått ut på å finne en mest mulig riktig klassifisering av mikroorganismene i syrevekkeren. Dette har bl.a. ført til at en har blitt klar over at syrevekker-organismene kan variere mye i sine biokjemiske egenskaper slik at man nå forsøker å redusere antallet av arter og bare angi avvikerne i biokjemisk henseende, som varieteter av en og samme art. Serologiske typebestemmelser, som særlig har vært utført av engelske forskere, har vist at både *S.lactis*, *S.cremoris* og *S.diacetilactis* hører til

Storch, V. 1890. Nogle Undersøgelser over Fløtens Syrning. 18. Beret. Forsøgslab. Kgl. Vetr. & Landbohøjskole.

Van Niel, C.B., Kluyver, A.J. & Derx. H.G. 1929. Über das Butteraroma. Biochem. Ztschr., 210: 234.

den samme serologiske gruppe.

Etter hvert som man har blitt mer klar over de stammemessige variasjoner hos melkesyrekulturene har seleksjonen av stammer med gunstige egenskaper blitt et viktig arbeidsfelt.

Studiet over symbiotiske og antibiotiske effekter er et annet felt som har stor betydning for utvikling av blandingskulturer.

På de store syrevækkerlaboratorier arbeides det idag med nye metoder for dyrking og andre former for leveranse av cellemateriale til de forskjelligste produksjonsformål og teknikken på dette området er under stadig utvikling.

Samtidig arbeides det stadig med de konvensjonelle kulturer som nyttes, med sikte på å komme frem til en optimalisering av vedlikeholdsbetingelsene for disse under praktiske forhold.

3. KULTUREN.

3.1. Mikroorganismene.

Skjønt det nyttes en rekke spesialkulturer til fremstilling av ost, er det den vanlige kombinerte meieri-bruks-syrevekkeren som her først og fremst skal behandles. Dette er den fundamentale kultur både for smør og osteproduksjonen, foruten til fremstilling av en rekke k-melkeprodukter, som vi her ikke skal komme nærmere inn på.

Den kombinerte meieri-brukssyrevekkeren består av mesofile streptokokker som ved ystingen har til oppgave å :

1. Innlede melkesyregjæringen (syrekonservering av kasinet).
2. Produsere nok CO₂ i osten til å gi en normal hulldannelse (for oster som skal ha tekstur).
3. Når cellene senere dør, deltar de autolyserte enzymer i modningen av osten.

Ved smørlagning er det ikke bare syredannelsen, men i første rekke dannelsen av aromastoffet diacetyl, som er av størst interesse.

Diacetyl sammen med andre smakskomponenter som CO₂, acetaldehyd, etylalkohol etc. er av stor viktighet i surmelk og ferskost-produkter i kombinasjon med en optimal surhetsgrad med hensyn til innhold av melkesyre.

Etter den inndeling av bakterier som nå er vanlig (Bergey's klassifiseringssystem) hører melkesyrebakteriene til familien LACTOBACILLACEAE (Gruppe 16) med slekten *Lactobacillus*, og familien STREPTOCOCCACEAE (Gruppe 14) med slektene: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus* og *Gemella*. Representanter for de tre første slekter er typiske "kultur"-organismer.

3.1.1. Streptococcus.

Streptokokkene er en stor slekt av homofermentative melkesyredannere som er delt i fire grupper. De viktigste kriterier for klassifiseringen av streptokokkene er vist i tabell 3.1.1.1.

Streptokokkene i syrevekkeren inngår i den såkalte lactisgruppen, som utgjøres av de tre arter *S.lactis*, *S.cremoris* og *S. diacetylactis*. Blant disse er det et stort antall varieteter, og mange forskere mener at oppdeling i tre forskjellige arter er uberettiget. (Redusert til to arter etter siste revisjon av Bergey's manual)

Ved klassifisering av syrevekkerens organismer er det første problemet å kunne skille de ovenfor nevnte organismer fra andre streptokokker. Til en viss grad kan klassifiseringen baseres på kriterier som pH og temperaturinnvirkning på vekst, samt resistens mot visse kjemiske forbindelser f.eks. NaCl, metylenblått etc.

Klassif
pH
temp
kjem

Andre viktige kriterier er basert på biokjemisk aktivitet, som uttrykt ved forgjæring av forskjellige sukkerarter (særlig studert av Orla-Jensen), ammoniakk fra arginin, forgjæring av citronsyre o.s.v.

biokj

Siden Shattock & Mattick (1943) viste at *Sc.lactis* tilhørte en spesiell serologisk gruppe (gruppe N) forskjellig fra de andre gruppene i Lancefields system, og det senere er vist at *Sc.cremoris* og *Sc.diacetylactis* tilhører samme gruppe, har også serologisk klassifisering blitt et viktig kriterium.

I vanlige syrevekkere kan en normalt se bort fra pyogene streptokokker. Følgende kriterier blir vanligvis brukt for skilling fra de øvrige grupper:

Tabell 3.1.1.2.

Test Gruppe	Vekst ved			Reduksjon av lakmusmelk.	Syre produsert fra:	
	45°C	6,5 % NaCl	pH 9,6		Sorbitol	Saccarose
Viridans	+	-	-	-	-	+
Lactis	-	-	-	+	-	-(+)
Enterococcus	+	+	+	+	+	- +

Shattock og Mattick, 1943. The serological grouping of *Streptococcus lactis* (group N) and its relationship to *Streptococcus faecalis*. J. Hygiene 43,173.

Dersom en i en syrevækker finner bakterier som ikke vokser ved 45°C, ved en saltkonsentrasjon på 6,5 % og ved en pH på 9,6, men som reduserer lakmusmelk relativt hurtig, vokser ved en lavere temperatur, saltkonsentrasjon og pH, er det praktisk talt sikkert å klassifisere dem som tilhørende lactisgruppen.

For å skille mellom streptokokkene lactis, cremoris og diacetylactis nyttes følgende kriterier:

Tabell 3.1.1.3.

Test Gruppe	Forgj. av citron- syre	Hydro lyse av arginin	Vekst ved 40°C	Vekst ved 4 % NaCl	Vekst ved pH 9,2	Syre fra	
						Maltose	Dekstr
Sc.lactis	-	+	+	+	+	+	+
Sc.diacetyl- lactis	+	+	+	+	+	+	+
Sc.cremoris	-	-	-	-	-	+-	+-

Både Sc.lactis og Sc.diacetylactis hydrolyserer arginin. Begge vokser ved 40°C, ved en konsentrasjon av 4 % salt og ved pH 9,2, mens Sc.cremoris ikke makter noen av delene.

Videre forgjærer Sc.lactis og Sc.diacetylactis maltose og dekstrin, mens Sc.cremoris er mer variabel i forhold til dette kriterium. Mange stammer av Sc.cremoris kan forgjære disse sukkerarter, men i alle tilfelle er forgjæringsevnen svak. I melk har S.cremoris vanligvis lengre kjededannelse enn S.lactis-diacetylactis.

Den eneste forskjellen mellom Sc.lactis og Sc.diacetylactis er at Sc.diacetylactis har evnen til å forgjære citronsyre. Denne evnen kan imidlertid tapes og S.diacetylactis skiller seg da ikke ut fra den normale S.lactis.

S.lactis produserer opptil 1 % høyeredreie melkesyrer i melk og pH ligger vanligvis mellom 4,3 og 4,5 med et celletall av størrelsesordenen 10^9 pr.ml under optimale dyrkingsbetingelser. S.cremoris

er gjerne noe svakere syredanner enn *S.lactis*/*diacetylactis*.

Det finnes også andre muligheter til å systematisere bakteriene i lactis-gruppen. Flere forskere har således funnet en karakteristisk forskjell i de respektive cellers aminosyreinnhold, ^{amino}like- ^{amino} som det er foreslått å nytte melkesyrebakterienes bakteriofag-spesifitet (virus) til å klassifisere den enkelte mikroorganisme. Den siste metoden er nyttet for stafylokokker, men ellers er disse metoder altfor omstendelige for vanlig rutinemessig taxomonisk arbeid.

Ifølge vedtatte karakteristika for de enkelte arter skulle klassifiseringen av disse foregå klart og utvetydig, men alle som har arbeidet med undersøkelser av kommersielle syrevekkere kan rapportere at de finner bare noen få ~~stammer~~ som tilfredsstillende oppsatte skjema. Størstedelen av de forøvrig "normale" stammer som finnes, avviker i en eller flere egenskaper fra det karakteristiske for arten. Jo flere kulturelle og biokjemiske tester som utføres desto større avvik finner en. Således fant Møller-Madsen (1958) ved en undersøkelse av 1750 stammer fra 36 kommersielle syrevekkere følgende fordeling-prosent:

Tabell 3.1.1.4.

	<u>Sc. diacetylactis</u>	<u>Sc.lactis.</u>	<u>Sc.cremoris.</u>	<u>Atypiske.</u>
7 egenskaper testet	5	2	37	56
5 " "x)	5	2	54	39

x) forgjæring av maltose og dekstrin utelatt.

Det viser seg at en finner stammer med nærsagt alle kombinasjoner av oppsatte egenskaper, noe som gir et bilde av en nærmest jevn overgang fra *Sc.lactis*/*diacetylactis* til *Sc.cremoris*. En mulig årsak til de mange varieteter innen lactisgruppen kan skyldes mutasjoner d.v.s. spontane endringer i cellenes arvestoff. I bakteriepopulasjoner forekommer vanligvis slike mutasjoner i én celle blant 10 milliarder og oppover til én celle av 10 tusen celler.

Møller-Madsen, 1961. On the composition of starters.
Symposium on Starter Cultures. Alnarp 1961.

I renkulturer av *S.lactis* og *S.cremoris* har man funnet at helt opp til 2 % av celledmassen består av individer som har en svakere evne til melkesyregjæring enn de øvrige og dermed gir en senere koagulasjon ved dyrkning i melk. (Harriman og Hammer 1931, Hunter 1939).

Swartling og Lindgren (1958)* undersøkte alle understammer av *S.cremoris* ved spredning av en renkultur og fant følgende fordeling med hensyn til koagulasjonstid:

Tabell 3.1.1.5.

% av stammer (d.v.s. kolonier ved spredning på fast medium). Koagulasjonstid i døgn.

21	1
53	2
24	3
2	7

Overstående forsøk skulle vise at evnen til melkesyredannelse har en stor variasjonsbredde. For praktiske syrningsformål er det av stor betydning at man opprettholder en sterk melkesyregjæringsaktivitet i kulturen. Dette vil man også vanligvis få, fordi de aktive stammer i kulturen vil utvikle seg først og dermed dominere i antall.

S.lactis som koagulerer melk langsomt har fått varietetsbetegnelsen tardus. En annen varietet, anoxyphilus er svakt reduserende og reduserer ikke lakmusmelk før koagulasjon.

S.lactis kan også være slimdannende. Disse har fått varietetsbetegnelsen hollandicus og nyttes bl.a. til tettemelk og i den svenske långfil. Evnen til slimdannelse kan variere sterkt. Enkelte

x) Swartling og Lindgren, ikke publisert.

Harriman og Hammer, 1931. Variations in the coagulation and proteolysis of milk by *Streptococcus lactis*. J.Dairy Sci.14,40.

Hunter, 1939. Examples of variation within pure cultures of *Streptococcus cremoris*. J. Dairy Res. 10,464.

stammer av *S.lactis* har også en eiendommelig evne til å gi en malt-liknende aroma, som regnes som smaksfeil både i kulturmelk og smør. Egenskapen er meget stabil og har gitt opphav til varietetsbetegnelsen maltigenes. Selve smaks-stoffet viser seg å være 3-metyl-butanal, $\text{CH}_3 - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{CH}_2 - \text{CHO}$. (fra α -aminoisokapron = Leucin).

3.1.2. Pediococcus. - velst vanligvis i melke i mycelle

Slekt nr. 3. *Pediococcus*, har også vært påvist i syrekulturer og har leilighetsvis vært brukt i handelssyrevekkere. Senere forskere (Garvie 1960) mener at dette kan være den samme bakterie som Orla Jensen beskrev som *Bc.bovis*. En art av *Pediococcus* produserer diacetyl.

Som nevnt vet en ennå ikke hvor stor rolle slekten *Pediococcus* spiller i syrevekkeren. De forekommer ofte i gjærende fruktsafter og i øl. Taxomonisk står *Pediococcus* svært nær *Leuconostoc*. Den viktigste forskjell er at *Pediococcus* produserer inaktiv melkesyre mens *Leuconostoc* har venstredreie melkesyre.

- fysiologisk uønsket, sjc notat.

Slekten har fem arter:

- Pediococcus cerevisiae* - velst i øl, prod diacetyl uønsket 'gj' setsmaler
- Pediococcus acidilactici*
- Pediococcus pentosaceus*
- Pediococcus halophilus*
- Pediococcus urinae equi*

Disse skilles etter deres evne til å vokse i vørter (uten humle) og i øl. Bare den første vokser i øl. *Ped.cerevisiae* kan produsere diacetyl ved oksydasjon av acetoin, og er derfor årsak til smaksfeil ved øl-produksjon. *Pediococcus* skiller seg fra *Leuconostoc* ved at cellene deler seg i to plan slik at det dannes "pakker" på 4 celler i likhet med *Sarcina*.

Lik *Leuconostoc* har *Pediococci* et stort behov for vitaminer og aminosyrer og vokser vanligvis ikke i skummet melk uten tilsetning av vekstfaktorer.

Garvie, E.I. 1960. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Sci.* 40: 1046-1052.

Orla-Jensen. The lactic acid bacteria. And.Fred. Høst & Søn, København. 1919.

Pediococcus cerevisiae fordrer en bestemt vekstfaktor (leucovorin, et folinsyrederivat) for å kunne vokse. Dette finnes ikke i fersk melk, men det synes som Sc.lactis/cremoris i kultur er istand til å frembringe de nødvendige mengder av denne vekstfaktor (Møller-Madsen).

3.1.3. Leuconostoc.

Slekten Leuconostoc skiller seg fra de andre kokkene i kulturen ved at de bl.a. foretar en heterofermentativ melkesyregjæring, og i motsetning til streptokokkene danner venstredreie melkesyre.

fysiologisk upånskelig diare

Foruten i melk og melkeprodukter forekommer Leuconostoc ofte på grønnsaker og annet plantemateriale.

I melk danner Leuconostoc ikke så mye syre at melken koagulerer og for å få disse til å vokse i renkulturen må melken gjerne tilsettes ekstrakter av gjær , tomat og grønnsaker.

Mangan virker dessuten stimulerende både på vekst og citratforgjæring hos Leuconostoc. Dette kan man gjøre bruk av i blandingskulturer som har fått et for lavt innhold av Leuconostoc.

Leuconostoc har noe lavere temperaturoptimum for vekst (21-25°C) enn streptokokkene (30°C). De vokser som diplococcer eller i lengre kjeder. Lakmus reduseres ikke. opt

Leuconostoc vokser vanskelig ved lavere pH enn 5,5, men tåler større konsentrasjoner av melkesyre enn streptococcene. Det er lettere å isolere Leuconostoc fra gamle kulturer.

I en kultur der Leuconostoc er eneste citratforgjærer, er det derfor viktig at man får en god vekst på disse før streptokokkene får produsert så mye syre at veksten stopper opp. Selve aromagjæringen hos Leuconostoc skjer først etter at celledelingen har opphørt og pH passert 5,0 (optimalt ved pH 4,1-4,3). Leuconostoc skiller seg sterkt fra S.diacetilactis i dette henseende.

produserer syre i stabil fase.

Tre arter leuconostoc skilles fra hverandre ved forgjæringsprøver på forskjellige sukkerarter:

Tabell 3.1.3.1.

	Vekst ved 37°C	Xyl- ose	Fruk- tose	Man- nose	Mal- tose	Sacca rose
--	----------------------	-------------	---------------	--------------	--------------	---------------

L.mesenteroides	+	+	+	+	+	+ (uinteressant prod + ikke diacetyl + slimdanner)
L.dextranicum	+	-	+	+	+	
L.citrovorum = cremoris	-	-	-	-	-	-

L.mesenteroides produserer ikke diacetyl og har derfor ingen interesse i denne sammenheng.

L.dextranicum er slimdannende idet den produserer polysakkarider (dextraner) fra saccarose.

Skillet mellom Leuconostoc dextranicum og citrovorum er imidlertid usikkert på grunnlag av saccaroseforgjæringen.

To stammer i vår besittelse, den ene levert fra ATCC (American Type-Culture Collection) merket L.cremoris, den andre isolert av oss fra god gardsrømme, forgjærer begge saccarose og danner lange kjeder. Den siste forgjærer også arabinose, men ikke xylulose.

Ingen av disse danner imidlertid dextraner og er således ikke slimdannere.

Garvie (1969) har foreslått at betegnelsen L.citrovorum utgår og at betegnelsen L.cremoris nyttes om de stammer av Leuconostoc som ikke forgjærer saccarose.

^{CREMORIS}
L.citrovorum = Bc. cremoris er holdt for å være den egentlige "aromadanner" i kulturen, men en skal også merke seg at Sc. diacetylactis produserer diacetyl. Dette skal vi komme tilbake til senere.

Prod diacetyl: Lc. cremoris
Sc diacetylactis

Garvie, 1969. Request for an opinion that the name L.citrovorum be rejected and the name L.cremoris be conserved. Int. J. syst. Bact. 19(3): 283.

I dag er det de store syrevækker-laboratorier som setter sammen stammene i kulturen og sammensetningen kan variere mye. Kulturene kan bestå av fra en enkelt stamme av en art og opptil mange stammer av flere arter med varianter. Enkeltstammekulturer blir imidlertid bare anvendt til ysting, særlig cheddarost.

Blandingskulturen som anvendes hos oss kan deles i tre grupper etter innholdet av mikroorganismer.

1. S.lactis-cremoris + Lc. ~~citrivorum~~^{cremonis} (L-syre).
 2. " " + S.diacetilactis (D-syre).
 3. " " + " + Lc. ~~citrivorum~~^{cremonis} (DL-syre).
 4. S.lactis + cremoris (O-syre)
- Det kan her være en eller flere stammer av hver art.

Kontroll av kulturen er enklere når det er få stammer tilstede.

Enkelt-stamme-kulturen er på den andre siden mer mottagelig for fag-angrep.

Fager eller mer korrekt bakteriofager er en virus som angriper bakterier, og denne virusen er ofte så strengt spesifikk at den vanligvis bare angriper en bestemt stamme innen en art. *kel!*

De homologe bakteriofager og celler passer til hverandre som en nøkkel til en lås. Muligheten for at en samtidig skal få infisert en kultur med bakteriofager som kan angripe alle stammer i kulturen er minimal og flerstamme-kulturer er derfor det vanlige, unntatt til spesialformål. *90% av springflemmingene skuldast bakteriofager*

Våre vanlige meieribrukssyrevekkere er gjerne blandingskulturer av to eller flere stammer av hver av de nevnte typer. I en balansert kultur vil vanligvis de citratforgjærende organismer d.v.s. aromaproducentene i antall utgjøres ca. 13 % av kulturens mikroorganismer. En amerikansk undersøkelse (av 72 forskjellige kulturer Overcast & Skean) viste at dette tallet varierte lite.

OVERCAST & SKEAN, 1964. Population of citratfermenting bacteris in Lactis cultures. Milk and Food Techn 27(1).64

Lode (1973) undersøkte totalinnhold og antall citratforgjærere for de mest brukte danske syrevekkere ved ankomst fra leverandøren.

Det totale bakterieinnhold var meget stabilt og i størrelsesordenen fra 400-600 millioner pr. ml.

Antall citratforgjærere utgjorde fra 10 til 16 % av totalantallet. De citratforgjørende organismer i kulturen er *S. diacetylactis* og *Lc. citrovorum*. Av disse har den første den kraftigste citratforgjøring i det den foregår parallellt med forgjøringen av lactose til melkesyre. For *Leuconostoc* starter først citratforgjøringen etter at den vesentligste melkesyregjøringen i kulturen er unnagjort og pH i miljøet har blitt senket til ca. 5,0. ^{citronsyre} ^{t. p. a.} ^{S. diacetyl}

Da *Leuconostoc* er en langt mere kravfull organisme med hensyn til næring og miljø enn *S. diacetylactis*, vil den etter gjentatte forplantninger lett bli dominert av ^{sistnevnte} som aromaproducent i kulturen og i mange europeiske kulturer var det for noen år siden vanskelig å påvise *Leuconostoc* i det heletatt.

Chr. Hansens Laboratorium opplyser i sin kulturbrosjyre at man for blandingskulturer nå tilstreber et innhold på 10 % *Lc. citrovorum* og 20 % *S. diacetylactis*. Dette skulle da tilsi 30 % citratforgjørende organismer i kulturen.

Arbeid: Lode, 1973. Verknad av inkubasjonstid o.s.v.. Melding nr. 171 fra Meieriinstituttet ved NLH.

I følge den svenske syrevækkerkontrollen som også omfatter differensiering av de citratforgjærende organismer i kulturene, fant en for tre danske kulturer følgende tall etter Anderson (1968):

Tabell 3.1.3.2.

Kulturer fra:	Chr. Hansens Laboratorium.		Flora Danica			
			normal		spesial	
Ar:	1966	1967	1966	1967	1966	1967
Totalantall mill. pr. ml.	860	800	760	710	760	780
% citratforgj.	12,7	20,1	5,5	8,7	4,9	7,8
<u>S.diacetilactis</u>	<u>10</u>	<u>15</u>	<u>5</u>	<u>8</u>	<u>7</u>	<u>8</u>
<u>Lc.citrevorum</u>	<u>80</u>	<u>85</u>	<u>95</u>	<u>92</u>	<u>93</u>	<u>92</u>



Blir forskyvde sterkt ellers velst

Syrevækkerlaboratoriene ser ut til å satse på et høyt innhold av Leuconostoc i ferske kulturer, men som foran nevnt vil dette kunne forskyves sterkt etter gjentatte ompodinger.

Anderson gir et eksempel på dette der en kultur har vært forplantet på et meieri i 55 døgn:

Tabell 3.1.3.3.

Innhold i prosent:	Ny kultur		Modersyre etter		
	orginalpakn.	9 døgn	35 døgn	55 døgn	
Diacetilactis	2	54	81	73	
Leuconostoc	98	46	19	27	

Et av de vanskeligste problemer man har i syrningsteknikken er å opprettholde stabilitet og riktig balanse i kulturen.

✱

3.2. Kulturmaterialiet.

De fleste syrevekkerlaboratorier leverer sine kulturer både i flytende form og som frysetørrete preparater. Tidligere var den flytende kulturen, med naturell melk som substrat så og si enerådende og denne form for syrevekkerpreparat er stadig den vanligste og rimeligste. Svakheten ved flytende kulturer er den begrensede holdbarheten man har på disse og man begynte relativt tidlig å eksperimentere med fremstilling av tørrede preparater. Dette ble til å begynne med gjort på den måten at man til en ferdigvokst kultur tilsatte stivelse, melkesukker, tørrmelk eller annet indifferert materiale for å absorbere endel av vannet, hvoretter blandingen ble tørret ved lav temperatur. Et stort antall celler ble ødelagt ved denne fremgangsmåten og de som overlevde prosessen var gjerne så svekket at det tok lang tid og mange ompodninger før man med utgangspunkt i en slik kultur fikk en aktiv syrevekker. Til lagring av tørrpreparater nyttes idag utelukkende moderne frysetørringsteknikk som gir en meget skånsom behandling av cellene og preparater med relativt stor aktivitet, samtidig med en usedvanlig god holdbarhet. En tredje form for syrevekker-leveranse er de mer og mindre konsentrerte kulturer, dypfrost eller frysetørret som enkelte syrevekkerlaboratorier i USA og på kontinentet nå har begynt med.

3.2.1. Flytende kulturer.

*boka er gammel og
har ikke fått med seg
utviklinga dei seinere åre*

Flytende kulturer omsettes på små flasker i isolerende spesial-embalasje. (Innstøpt i Isopor).

Fordelen med flytende syrevekkere er at kulturen vanligvis kommer raskere igang fra denne, enn om man anvender tørrpreparater. På den andre siden er holdbarheten på en flytende kultur sterkt begrenset og en bør kreve at kulturen når bestemmelsesstedet i løpet av 36 timer. Selv om flytende kulturer gjerne er tilsatt kritt for å nøytralisere den skadelige effekt melkesyren har på cellene, bør kulturen forplantes snarest mulig etter ankomst til meieri og inntil dette skjer oppbevares kaldt.

3.2.2. Tørrpreparater.

Tørrpreparater får man ved å hurtigfryse kulturen ved minus 70-80° og deretter tørre under vakuum. Ved hensiktsmessig frysetørring overlever over 80 % av cellene. Disse lever i en passiv tilstand der alt stoffskifte har stoppet opp. Slike preparater har en usedvanlig god holdbarhet. Cellene trenger imidlertid vanligvis noe lengre tid på seg til reaktivering enn ved bruk av flytende kulturer, ofte trengs 8-10 omplantinger før modersyren blir god, men den moderne frysetørringsteknikken har stadig blitt forbedret slik at preparatene har blitt mer aktive. På grunn av den gode holdbarheten, bør meieriene alltid ha noen frysetørrede kulturer på lager.

For blandingskulturen skal en være oppmerksom på at frysetørringen kan forskyve forholdet mellom artene i kulturen.

3.2.3. Konsentrerte kulturer.

Dette representerer et helt nytt prinsipp i syringsteknikken.

I Skandinavia er det hittil bare Chr. Hansens laboratorium som har satt igang produksjon av konsentrerte kulturer, men da systemet har mange fordeler må en vente at det vil ha fremtiden for seg.

Produksjonsdiagram er vist på fig. 3.2.3.1.

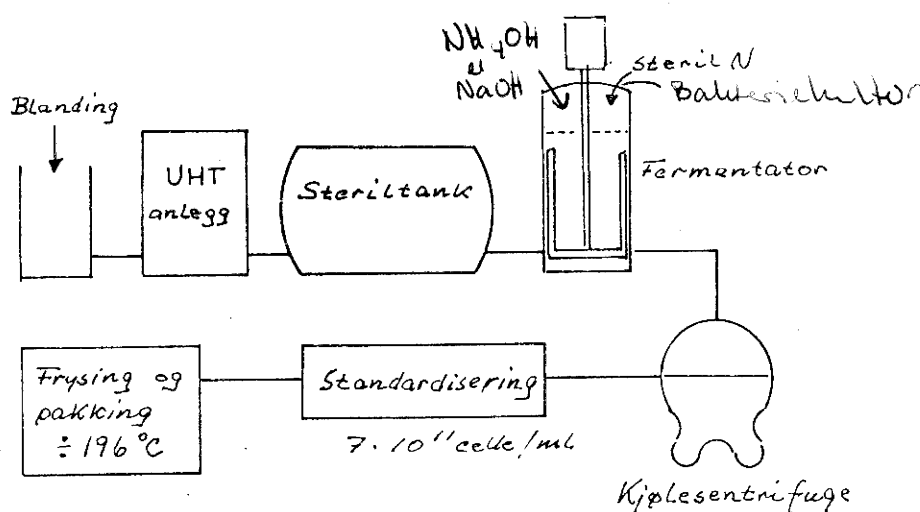


Fig. 3.2.3.1. Produksjonsdiagram for fremstilling av konsentrerte kulturer.

Kulturene kan f.eks. dyrkes på myse tilsatt gjærekstrakt og tryptophan. En må her nytte et næringsmedium der proteinet ikke koagulerer under kultivering. For å få maksimalt celleutbytte blir pH holdt konstant i fermentatoren. Renkulturer av *S.lactis* blir f.eks. dyrket ved pH 6,3 ved 30°C.

Etter at det maksimale celletall er nådd blir kulturen sentrifugert på en spesiell kjølesentrifuge. Cellekonsentratet blir deretter standardisert på $7 \cdot 10^{11}$ celler pr. ml og pakket i bokser som øyeblikkelig fryses ned i flytende nitrogen (-196°C). Forsendelsen foregår også i flytende N. Ved å hurtigfryse kulturen ved denne temperaturen holder enzymene seg like aktive som ved dyrkings-temperaturen.

Fordelene med systemet er først og fremst:

1. Modersyrekulturen kan kuttes ut.
2. Podemassen har en standardisert sammensetning og er alltid den samme.
3. Bare en liten podemengde er nok til syrning av store kvantiteter. 40-75 ml cellekonsentrat er nok til fremstilling av 1000 l brukssyre for osteproduksjonen. Til fremstilling av surmelk-drikker nyttes podematerialet direkte.

Det er uvisst når dette systemet vil slå igjennom hos oss og foreløpig må en vel innstille seg på den konvensjonelle delte syrelaging med modersyre og brukssyre.

3.3.Stoffomsetningen i syrekulturen.

Den viktigste stoffomsettingen som foregår i syrekulturen er melkesyregjæringen. Ved siden av denne får en også små mengder av eddiksyre, acetaldehyd, alkohol, maursyre og CO₂. Alle disse produkter oppstår vesentlig ved nedbryting av lactosen, i mindre omfang ved spalting av organiske syrer.

Dernest blir melkeproteinene mer og mindre nedbrutt slik at det frigjøres visse peptider og aminosyrer. (10-20 % LN i kritt-kulturer ifølge Barthel).

skal

Når det ^ggives en oversikt over substratets nedbygging ved melkesyrebakterienes stoffskifte, må en skille mellom homofermentative og heterofermentative organismer. Nedbrytingen av sukkeret foregår her nemlig på to forskjellige måter.

homoferm

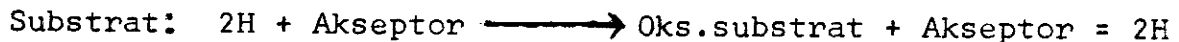
Hos de homofermentative melkesyrebakterier dannes det hovedsakelig melkesyre som sluttprodukt med små variable mengder av andre stoffer så som CO₂, maursyre, eddiksyre og alkohol.

heteroferm

Hos de heterofermentative organismer dannes disse stoffer i tilnærmet ekvimolare mengder.

For å kunne utføre sine biosynteser trenger mikroorganismene energi og denne skaffer de seg ved å oksydere substratet. Gjennom en serie oksydasjonstrinn, katalysert av spesifikke enzymer, frigjøres den energi som blir brukt til å holde livsprosessene oppe og til syntetisering av nytt cellemateriale.

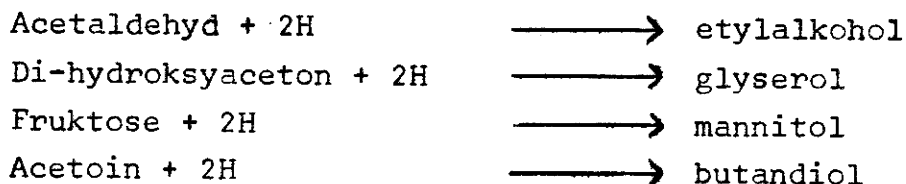
Den innledende oksydasjon av substratet skjer ved fraspalting av hydrogen og forat denne prosessen skal kunne gå må man ha en hydrogenakseptor. Denne blir så redusert:



For de mikroorganismer som kan nyttiggjøre seg luftens oksygen (aerobe) blir oksygenet den endelige hydrogenakseptor slik at sluttproduktet blir vann, H₂O. Anaerobe organismer kan ikke føre oksydasjonen så langt frem. Andre hydrogenakseptorer trer her i funksjon og andre sluttprodukter dannes. For melkesyregjæringen er pyrodruesyren " slutt-akseptoren" som dermed reduseres til melkesyre.



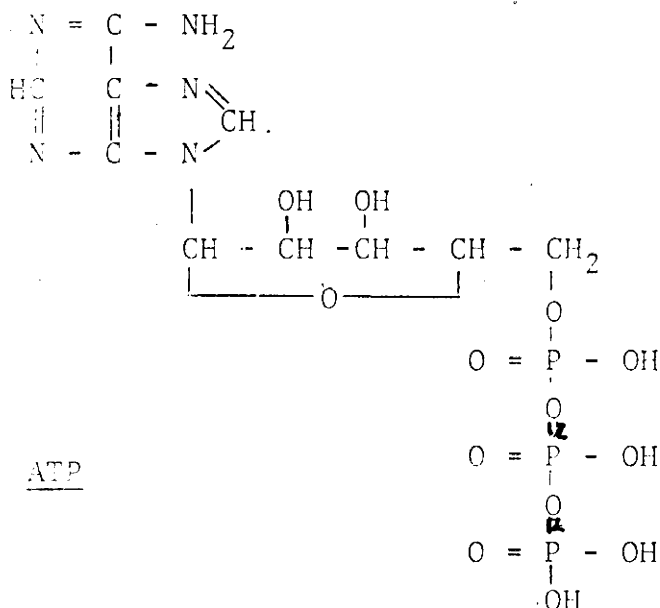
Typiske akseptorer for andre typer av gjæring er:



De mest vanlige hydrogenakseptorer er generelt aldehyder og organiske syrer som da reduseres til alkoholer. Ketoner som reduseres til sekundære alkoholer er også vanlige og man har videre eksempler på etylendobbelbindinger som reduseres til mettede karbonkjeder.

3.3.1. Energioverføringen ved adenosinfosfat.

ADP og ATP, adenosindifosfat- og adenosin-tri-fosfat er stoffer som spiller en sentral rolle ved overføring av energi i de biokjemiske prosesser. Adenosin (N-base + pentose) forestret med fosforsyre (AMP) bygges opp til di-fosfat og trifosfat under opptak av uorganisk fosforsyre ved de eksogene prosessene.

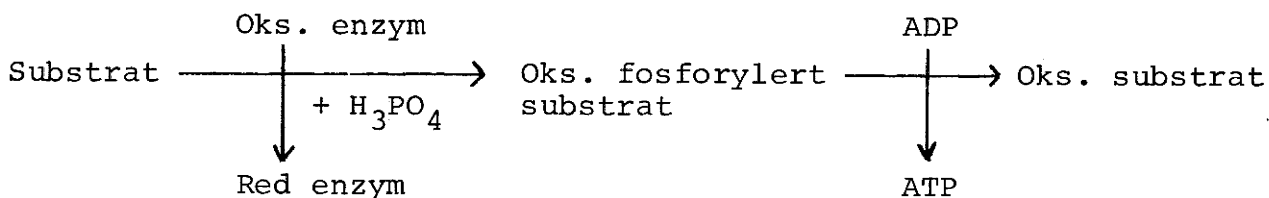


Esterbindingene mellom de to siste fosforgruppene i ATP er meget energirike og frigjør ved hydrolyse helt opp til ca. 12 000 kal pr. gram mol. (avhengig av pH), mens en vanlig uorganisk fosforsyreester ved hydrolyse bare frigjør ca. 2 500 kal/gram mol.

3074 KJ

691 KJ

Skjematisk kan den biologiske oksydasjon av et substrat beskrives på følgende måte:



Under melkesyregjæringen fremskaffer mikroorganismene i kulturen de nødvendige mengder ATP for å underholde de endogene reaksjonprosesser. Nettoutbyttet av ATP vil variere noe med gjæringsmønstret samtidig som " det oksyderte substrat " vil bestå av forskjellige slutt-produkter.

Ved den homofermentative forgjæring av lactosen får man som nevnt praktisk talt bare melkesyre som sluttprodukt. Vi skal imidlertid merke oss at enkelte mikroorganismer forgjærer melkesukkeret "homofermentativt" men likevel gir flere sluttprodukter (eks. Pediococcus). Dette kommer av at de har flere ekstra enzymsystemer som kan tre i funksjon alt etter forholdene f.eks. pH i miljøet.

3.3.2. Sukkerforgjæringen.

*EMP → homoferm
Pentose 5-fosfat → heteroferm*

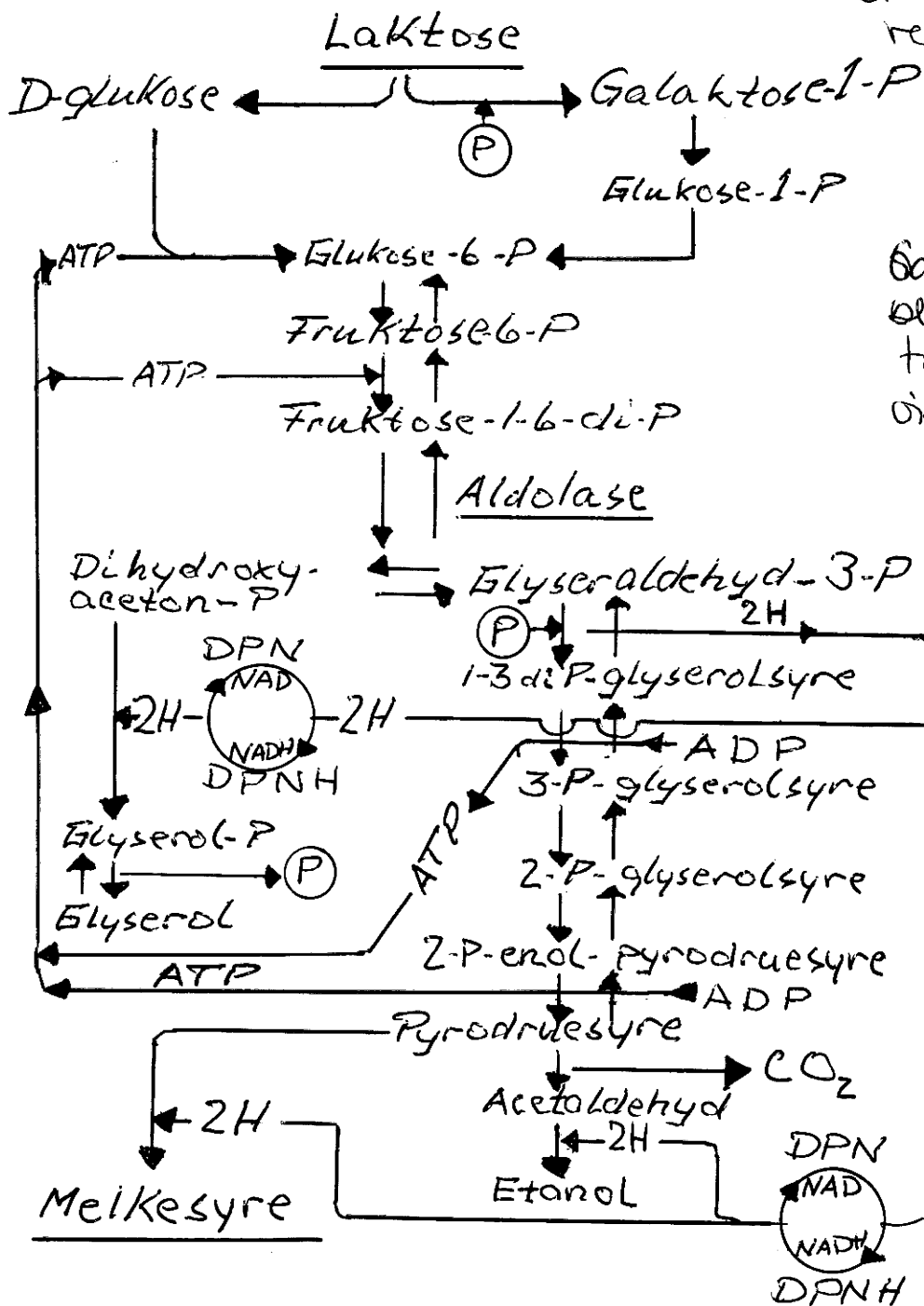
Nedbyggingen av sukkeret foregår som nevnt etter to forskjellige gjæringsmønstre enten etter det såkalte Embden-Meyerhof Parnas gjæringsskjema, som omfatter den homofermentative melkesyregjæringen eller det såkalte pentose-5-fosfat gjæringsskjema eller såkalt heterofermentativ sukkerforgjæring.

3.3.2.1. Embden - Meyerhof - Parnas - gjæringsskjema.

Embden Meyerhof Parnas gjæringsskjema er vist i fig. 3.3.2.1.1.. S.lactis - cremoris - diacetylactis og Pediococcus forgjærer lactose etter dette mønster. Her starter nedbrytningen av laktosen ved at denne spaltes i hexosene glukose og galaktose. Galaktosen omdannes så **enzymatisk** til glukose-1-fosfat ved opptak av uorganisk fosfat. Herfra starter den videre nedbryting så å si likt. Ved forgjæring av andre sukkerarter enn laktose blir også disse først nedbrutt til glukose eller glukosefosfat.

Om en bakterie skal kunne forgjære andre sukkerarter avhenger derfor av om de har de enzymesystemer (kinaser og epimeraser) som utfører denne innledende omdanning til glukose.

Fig. 3.3.2.1.1.



Kopi på stens mer rett.

Galaktose blir nedbrutt til Glyseral via D-glukose b-vægen

Nettoutbytte 5 ATP

Den videre nedbryting av glukosen går gjennom to fosforylerings-trinn og isomering til fruktose til fruktosedifosfat (FDP) som et viktig mellomprodukt.

Under innvirkningen av enzymet aldolase blir dette hexosefosfat spaltet i to triosefosfater, nemlig glyser-aldehydfosfat (GAP) og dihydroxyacetonfosfat (DAP). Ved oksydasjon av GAP og opptak av uorganisk fosfat får en 1-3 difosforglyserolsyre som ved transfosforylering med adenosindifosfat gir 3-fosforglyserolsyre (PGS). Den videre nedbygging går så over 2-PGS og fosforenol-pyrodruesyre til pyrodruesyre. Ved den siste omdannelsen blir fosfatgruppen overført til ATP slik at ved nedbygging av ett molekyl glukose til 2 mol pyrodruesyre samtidig fåes 4 mol ATP.

Med utgangspunkt i melkesukker blir det dannet 8 mol ATP pr. mol sukker, men nå brukes det også 3 mol ATP til fosforylering av hexosene. Pr. mol laktose får man altså et nettoutbytte på 5 mol ATP.

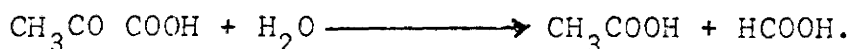
Ved oksydasjon av triosefosfat med DPN (disfosforpyridin-nucleotid) får en frigjort nok hydrogen til reduksjon av pyrodruesyre til melkesyre.

Når først reaksjonen har kommet igang (kommet langt nok ned i oksydasjonstrinn) fremskaffer systemet derfor sin egen H-akseptor (pyrodruesyre) slik at prosessen holdes ved like av seg selv.

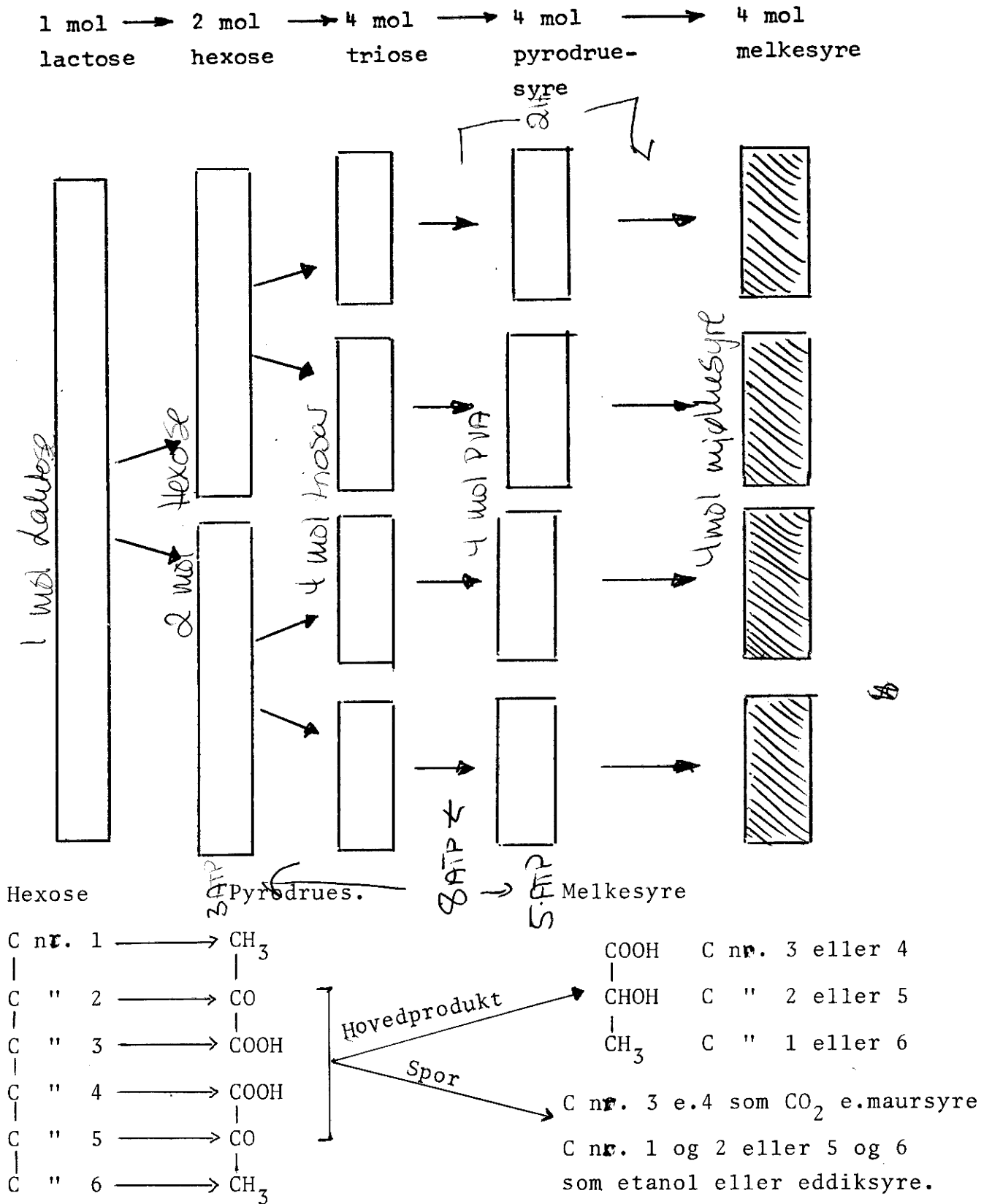
Mange organismer som f.eks. *pediococci* har ikke bare evnen til å redusere til melkesyre, men kan også spalte pyrodruesyre til CO₂ og acetaldehyd (på samme måte som gjær).



Videre kan acetaldehyd reduseres til alkohol eller oksyderes til eddiksyre. Enn videre er en såkalt hydroklastisk spalting av pyrodruesyra mulig, d.v.s. spalting i maursyre og eddiksyre.



I alle de tilfeller der det dannes CO₂, maursyre, acetaldehyd, alkohol og eddiksyre, dannes disse i et variabelt forhold til mol melkesyre. Avviket fra ren melkesyregjæring vil nemlig være bestemt av forskjellige ytre og indre forhold.



Figur 3.3.2.1.2. "Homofermentativ" sukkerforgjæring.

Med "homofermentativ" forstås en ren melkesyregjæring d.v.s. det dannes praktisk talt bare melkesyre ved forgjæringen av lactosen. Strengt tatt er det riktigere å si at det bare dannes pyrodruesyre ved forgjæringen av sukkeret. Det alt vesentlige av pyrodruesyren reduseres imidlertid til melkesyre.

Alle melkesyrestreptokokker produserer noe acetaldehyd i melkekulturen. Akkumulering av acetaldehyd i substratet varierer betraktelig mellom de forskjellige arter og innen stammer av artene p.g.a. varierende evne til å redusere til etanol.

Acetaldehyd
Yoghurt
Smak

En mindre mengde acetaldehyd synes å være nødvendig for å gi de fleste melkekulturer en rund avbalansert smak, men når innholdet av acetaldehyd blir for høgt får man en smak som minner om yoghurt.

Ingen andre aldehyder synes å forekomme for vanlige kulturer, men S.lactis var, maltigenes produserer som nevnt 3-metylbutanal, som den maltsmakende komponent, men også 2 metylbutanal, 2 metylpropanal, fenyl-acet-aldehyd og 3 metyl-thio-propanal fra de korresponderende aminosyrer.

En rekke av melkesyrebakteriene kan nyttiggjøre seg acetaldehyd og dermed redusere innholdet i kulturen. Særlig aktiv i så måte er Leuconostoc citrovorum og det er vist at CH_3CHO stimulerer veksten av denne i noen grad.

Acetaldehyd

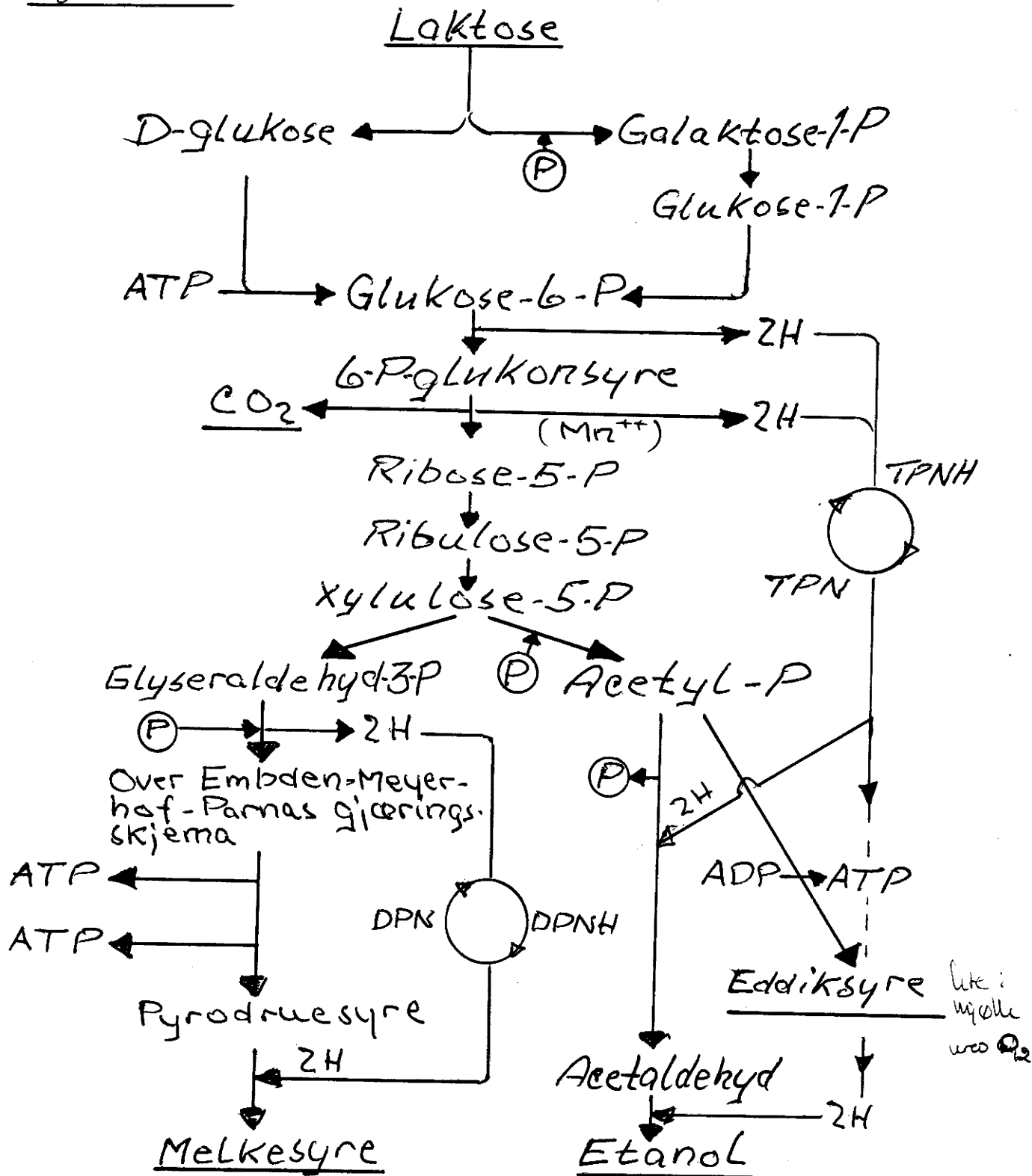
Acetaldehyd reduseres til alkohol og tjener som hydrogenakseptor. De aktuelle dehydrogenaser kan også benytte propionaldehyd som hydrogenakseptor, men ikke aceton og butanon.

3.3.2.2. Heterofermentativ gjæring.

Blant mikroorganismene i kulturen er det bare Leuconostoc som har en heterofermentativ sukkerforgjæring. Gjærings skjema er vist i fig. 3.3.2.2.1. Den innledende omdanning av laktose til glukosefosfat foregår som ved den homofermentative nedbygging, men ved

den heterofermentative sukkernedbryting får en ikke fruktosedifosfat (FDP) som mellomprodukt. Glukosen oksyderes direkte fra glukose 6-fosfat (G-6-P) til 6 fosforgluconsyre ved hjelp av Warburgs "mellomferment", Tripyridinnucleotid (TPN).

Fig. 3.3.2.2.1.



Nettoutbytte 2ATP

Angs å få kopiert Ny sensil

Pentose fosfat sidevegen

28

Det heterofermentative gjærings-skjema blir da også betegnet som "the monophosphate pathway".

Glukosyren dekarboxyleres oksydativt videre til Ribose og Ribulose-5 fosfat (Ru-5 P). Karbonatom nr. 1. spaltes her av som CO_2 .

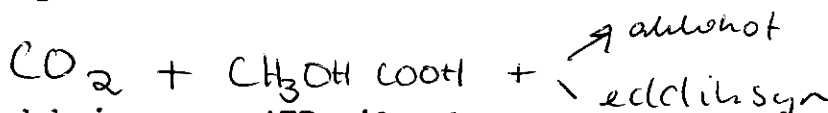
Den fosfor-glukosyredehydrogenasen som formidler oksydasjonen her må ha tilgang på Mg^{++} , Ca^{++} eller Mn^{++} -joner for å være aktivt. Særlig virker Mn^{++} aktiverende, mens Cu^{++} virker sterkt inaktiverende. (Mangantilsetning til L-syrer øker innholdet av Leuconostoc).

Mn^{++} kofaktor

Ribulose 5-fosfat omleires videre til xylulose 5-fosfat. Under opptak av en uorganisk fosfatgruppe blir så pentosen spaltet i et mol triosefosfat (GAP) og acetylfosfat.

Triosefosfat (GAP) omformes så til melkesyre som ved den homofermentative gjæringen, mens acetylfosfat ved hjelp av acetokinase og ADP går til eddiksyre + ATP eller det skjer en reduksjon til alkohol. Under anaerobe forhold skjer som regel en fullstendig reduksjon til alkohol. I nærvær av oxygen vil det gjerne oppstå vekslende mengder eddiksyre og alkohol.

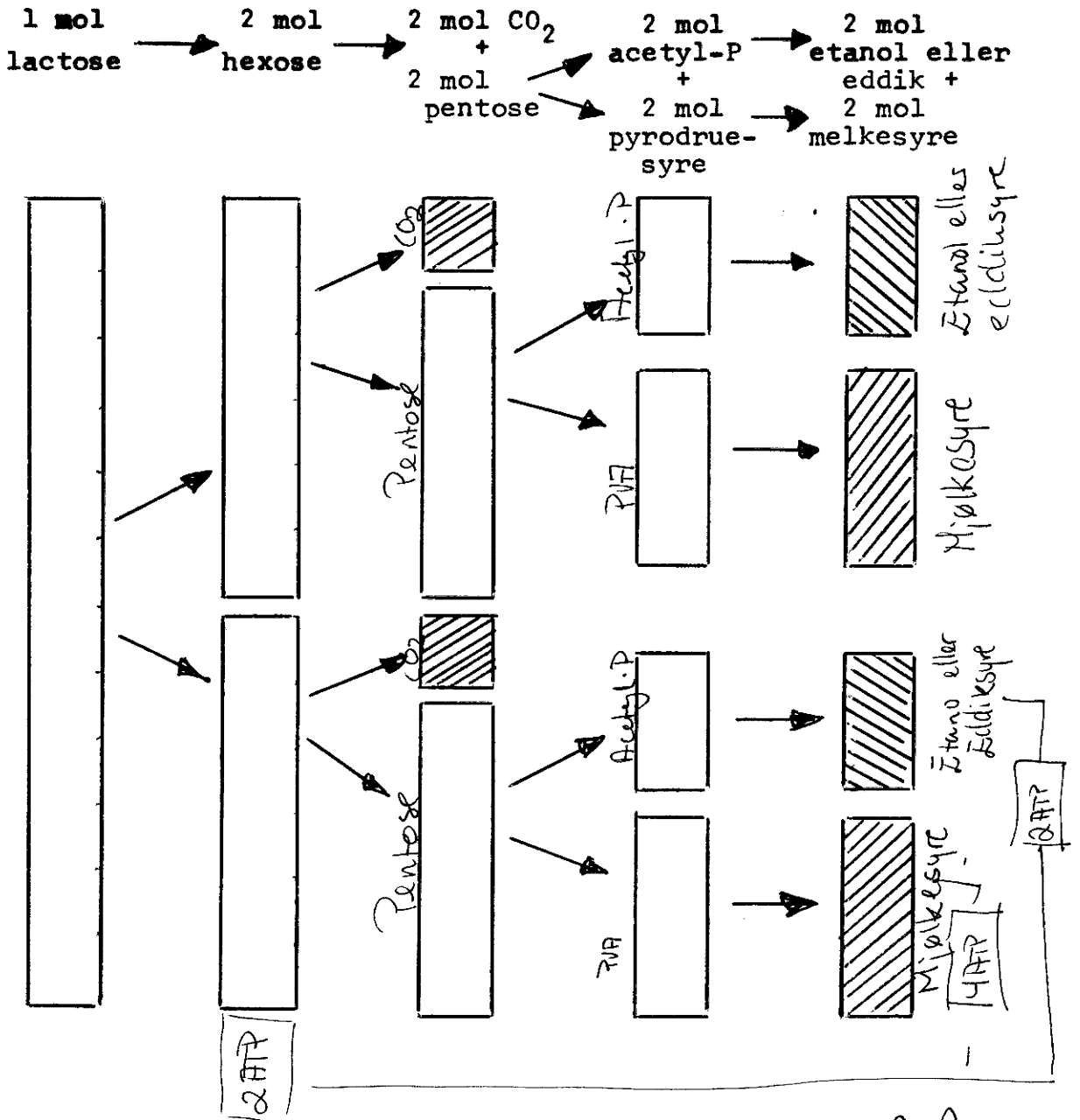
Som resultat av den heterofermentative gjæring får en av ett mol glukose: Ett mol CO_2 , ett mol melkesyre og ett mol alkohol eller eddiksyre.



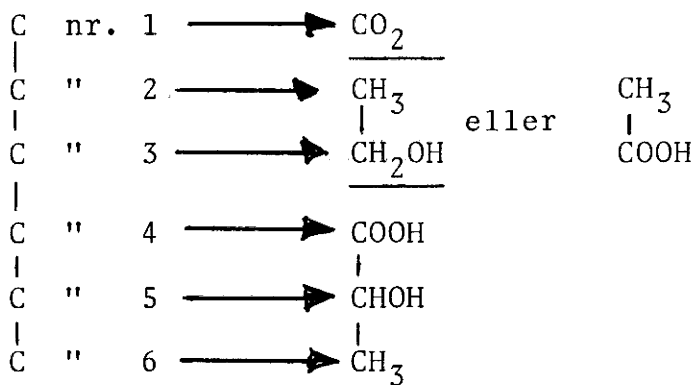
En ser at nettoproduksjonen av ATP vil avhenge av om man får dannet eddiksyre eller etanol. Går all acetylfosfat til eddiksyre får man en bruttoproduksjon på 6 mol ATP pr. mol laktose. Reduseres alt acetylfosfat til etanol blir bruttoproduksjonen 4 mol ATP. Da det i begge tilfeller brukes opp ett mol ATP til fosforylering av glukosen vil nettogevinsten av ATP ligge mellom 3 og 5 mol ATP pr. mol laktose. I praksis må en vel derfor regne med et noe lavere ATP-utbytte ved den heterofermentative sukkergjæring enn ved den homofermentative.

eddiksyre
6 ATP

etanol
4 ATP



Hexose



Netto energi: til etanol 2 ATP
til eddiks. 4 ATP

Fig. 3.3.2.2.2. Heterofermentativ sukkerforgjæring.

Merk at enzymet aldolase mangler ved den heterofermentative sukkerforgjæring. Glukose- og glukonsyredehydrogenasen mangler ved den homofermentative sukkerforgjæring.

Ved tracerteknikk har en vist at glukosemolekylet deles på midten ved den homofermentative nedbrytingen. Ved den heterofermentative gjæring vil hexosens C-atom nr. 1. (Keto-gruppen) dekarboksyleres til CO_2 . C-atom nr. 2 og 3 går til eddiksyre eller etanol, mens C-atomene nr. 4,5 og 6 går til melkesyre.

Gjæringsforløpet er vist skjematisk i figur 3.3.2.2.2.

3.3.2.3. Pyrodruesyrens muligheter i stoffomsetningen.

Både ved homofermentativ og heterofermentativ gjæring får en pyrodruesyre som et viktig mellomprodukt. Det viser seg at pyrodruesyren danner utgangspunktet for en rekke biokjemiske reaksjoner og synteser. Hos melkesyrebakteriene er hydrering til melkesyre den viktigste veien, men ved siden av denne kan det foregå en reduktiv aminering til alanin, som er en viktig byggesten i proteinsyntesen.

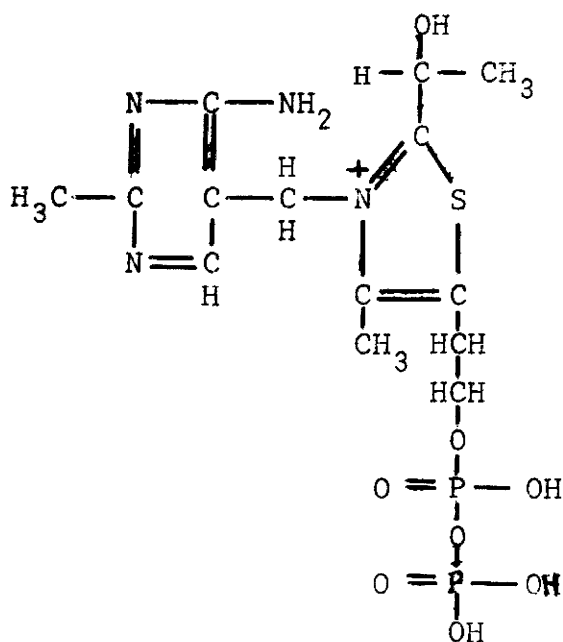
En viktig reaksjon hos melkesyrebakteriene er karboksylering av pyrodruesyre med CO_2 til oksaleddiksyre. Via denne kan melkesyrebakteriene syntetisere asparaginsyre, treonin og andre derivater av oksaleddiksyre. Ved "foring" av melkesyrebakterier med radioaktivt CO_2 finner en radioaktiviteten først og fremst igjen i form av asparaginsyre.

Pyrodruesyren kan videre nedbrytes til CO_2 og acetaldehyd. Dekarboksyleringen skjer ved hjelp av thiaminpyrofosfat (TPP). En får her et såkalt aktivt acetaldehyd i det dette bindes til thiazolgruppen i thiaminet. Fig. 3.3.2.3.1.

En rekke bakterier bl.a. *S. faecalis* kan oksydere dette videre til eddiksyre.

Ved opptak av et proton kan det aktiverte acetaldehyd gå over i fritt acetaldehyd, som videre kan reduseres til alkohol slik som hos gjær og *pediococcus*.

Fig. 3.3.2.3.1.



Acetaldehyd-TPP = "Aktivt acetaldehyd" (Carlson & Brown),
 Katalyserer dekarboksylering av pyrodruesyre.

3.3.3. Citronsyregjæringen. - skal få nytt - for dårlig

Blant mikroorganismene i syrekulturen er det *Leuconostoc* og *S. diacetylactis* (eventuelt *Pediococcus*) som har evnen til å forgjære citronsyre. Andre organiske syrer som f.eks. eplesyre kan også brytes ned, men i et substrat som melk er det bare citronsyren som har interesse. Betingelsen for citronsyreforgjæring er tilstedeværelse av minst to enzymsystemer, nemlig citrat permease, som katalyserer opptaket av citronsyren til cellen og citratase som katalyserer den innledende spaltning av citronsyre til oksaleddiksyre og eddiksyre. Både innen *Leuconostoc* og *S. diacetylactis* forekommer mutante celler som mangler det ene eller begge enzymer og har dermed mistet evnen til å kunne nedbygge **citronsyre**. En slik mutant av *S. diacetylactis* er i realiteten en *S. lactis*. På

samme måte som for sukker har en med hjelp av tracerteknikk klarlagt nedbyggingen av citronsyre molekylet. Dette er vist skjematisk i fig. 3.3.3.1.

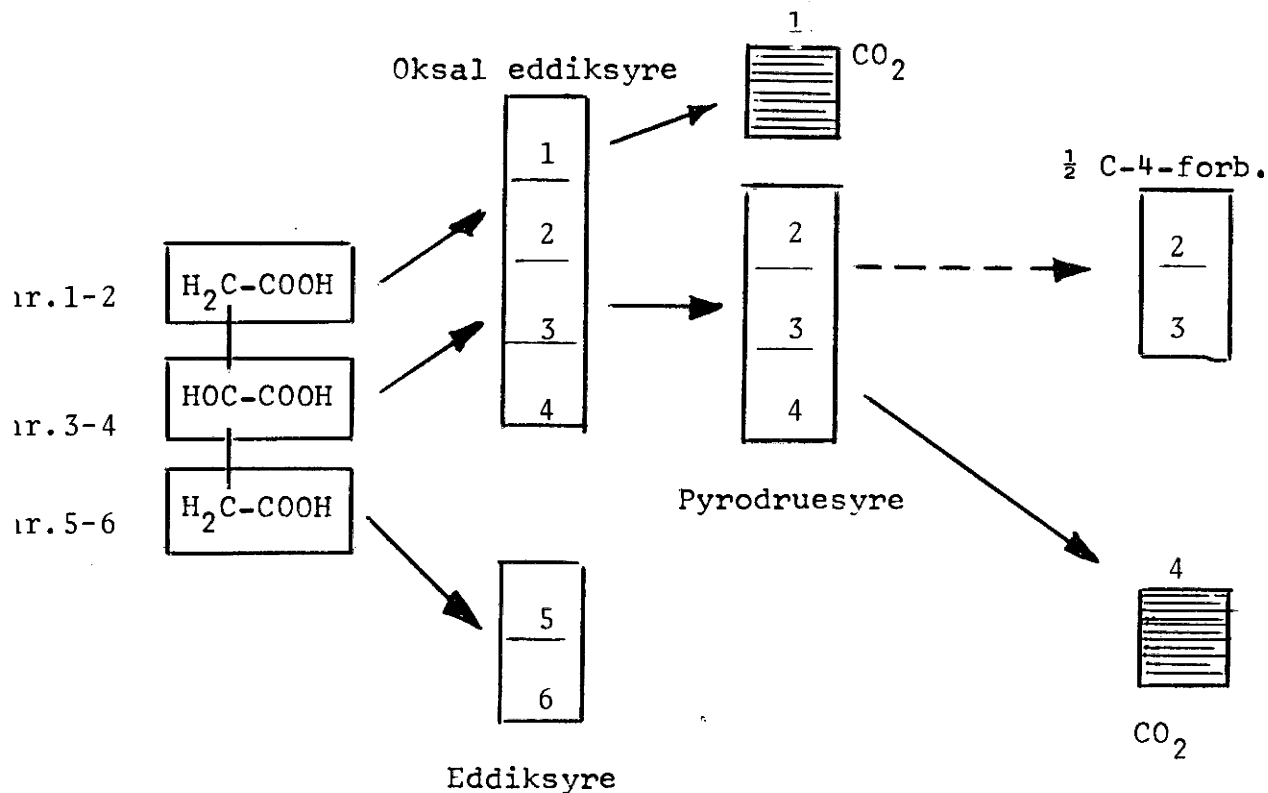


Fig. 3.3.3.1. Isotopfordelingen ved forgjæring av citronsyre.

Som det går frem av figuren har en også pyrodruesyre som et sentralt mellomprodukt under citronsyre gjæringen. På figuren har en antydnet at en del av pyrodruesyren kan omdannes til nøytrale C-4 forbindelser d.v.s. diacetyl, acetoin eller butandiol. Ett molekyl citronsyre kan i gunstigste fall gi $\frac{1}{2}$ mol C-4 forbindelse ved siden av 2 mol CO_2 og ett mol eddiksyre.

I praksis får man gjerne dannet noe mer eddiksyre på bekostning av C-4 forbindelsene.

3.3.4. C-4-forbindelsene.


Diacetyl $\text{CH}_3\text{Co.Co.CH}_3$ er det egentlige aromastoffet i smør og er den eneste diketon som er påvist i gode syrekulturer. Forbindelsen er vidt utbredt i naturen og forekommer bl.a. i jordbær, bringebær, melasse, øl, brød og brent kaffe.

I ren tilstand er diacetyl en lys gul-grønn væske med sterk lukt, kp. 88°C , sp.v. ($15/15^\circ\text{C}$) 0.9904.

Som andre α -diketoner er diacetyl et relativt reaktivt stoff som vil reagere med de vanlige karbonyl-reagenser.

Kjemisk kan ~~diacetyl~~ diacetyl dannes ved oksydasjon av acetoin. Det kan reduseres til acetoin og 2,3-butylenglykol (butandiol). *Besre lycin. ikke kant og gjer.*

Acetoin eller acetylmetylkarbenol $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CO} - \text{CH}_3$.

I ren tilstand er acetoin en lys gul væske eller et krystallinsk fast stoff (dimer), kp. 148°C , sm.p. 15°C , sp.v. $15/4^\circ\text{C}$ 1.002. Acetoin er løselig i alkohol og vann, men det er lite løselig i eter. I kontakt med luft oksyderes det gradvis til diacetyl. I syrekulturen foreligger acetoin i langt større mengder enn diacetyl. 

Forholdet mellom diacetyl og acetoin er ikke konstant og vil variere alt etter forholdene, og med de aktuelle kulturer. Se tabell 3.3.4.1.

Butandiol eller 2,3-butylenglykol, $\text{CH}_3 - \text{CHOH} - \text{CHOH} - \text{CH}_3$.

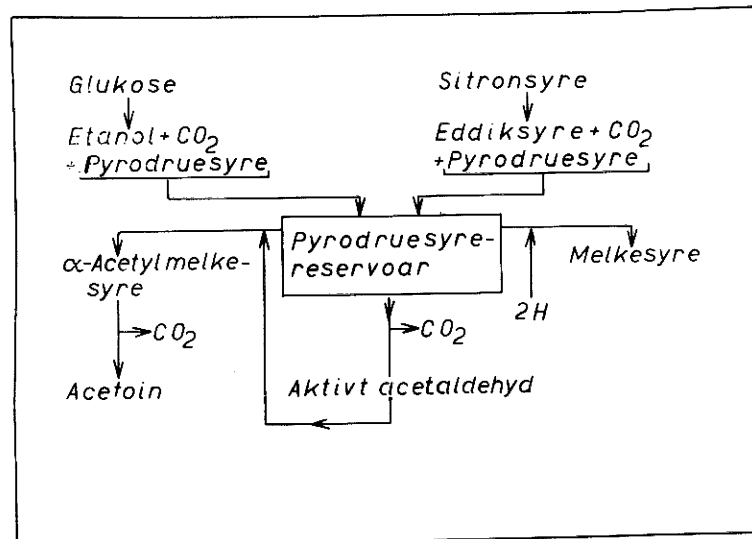
I ren tilstand er 2,3-butylenglykol en nesten fargeløs væske, kp. 184°C , sm. p. $23-27^\circ\text{C}$, sp.v. $0/4^\circ\text{C}$ 1.048. Forbindelsen er lett løselig i vann, alkohol og eter. I syrekulturen dannes 2,3-butylenglykol ved reduksjon av diacetyl og acetoin.

Hverken acetoin eller butandiol har verdi som aromastoffer. I praksis gjelder det derfor om å unngå reduksjon av diacetylet i størst mulig grad.

Dannelsesmåten til C-4-forbindelsene har vært mye diskutert gjennom tidene. De fleste forskerne mente at citronsyren var moderstoffet for aromagjæringen mens andre (bl.a. Virtanen) mente at citronsyre bare fungerte som en hydrogenakseptor og at lactosen var utgangspunktet for C-4-forbindelsene.

Med dagens kjen^{sk}skap til dannelsesmåten for C-4-forbindelsene må man gi de førstnevnte rett, i det det alt vesentlige av aromastoffet i syrekulturen dannes av melkens citronsyre eller dens nedbygningsprodukter, oksal-eddik- eller pyrodruesyre. Men pyrodruesyre får man også som sentralt mellompunkt ved sukkergjæringen.

Dette er vist skjematisk i fig. 3.3.4.2:



Ved tracerteknikk har man videre vist at det i prinsippet ikke er noen forskjell på den pyrodruesyre som stammer fra sukkerfor-gjæringen og den fra citronsyreforgjæringen.

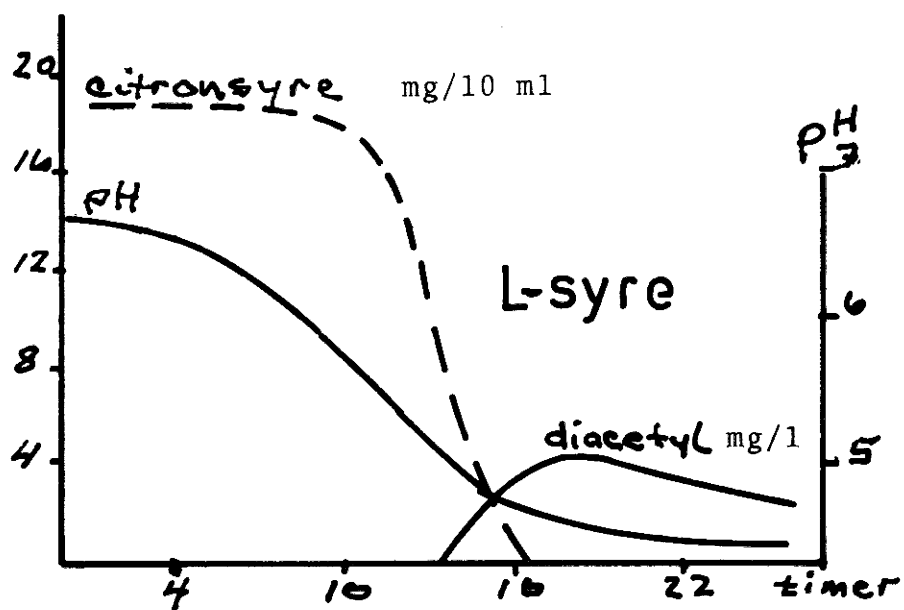
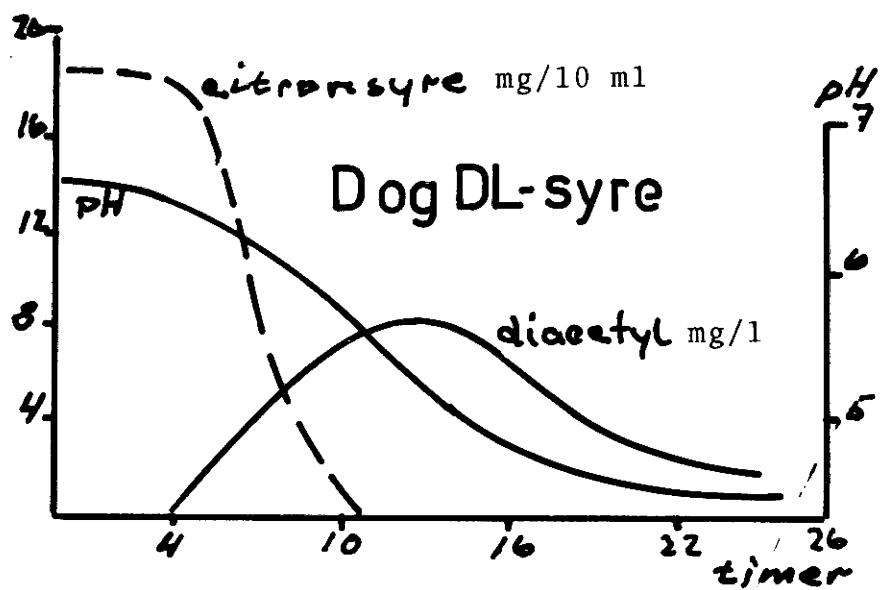
Ved bruk av isotop-merket sukker (glukose) sammen med umerket pyrodruesyre fant Kandler (1961) at det acetoinet som her ble dannet også var radioaktivt, men acetoinets aktivitet var bare 1/8 av glukosens spesifikke aktivitet. Dette betyr at den overveiende del av acetoinet (7/8) skriver seg fra den tilsatte pyrodruesyre med inaktivt karbon og bare 1/8 fra sukkeret.

Det viser seg at C-4 forbindelsene ikke dannes når man bare har sukker som kilde for pyrodruesyre. Bytter man ut sukker (glukose) med pyrodruesyre får man en kraftig acetoindannelse. I blandinger av glukose og pyrodruesyre får man med renkulturer av leuconostoc (ATCC 8082) ingen dannelse av C-4 forbindelser så lenge for-gjæringen av sukkeret går for fullt. Når konsentrasjonen av sukker synker slik at CO₂-utviklingen avtar fant Kandler at det ble dannet acetoin.

Årsaken til at acetoin ikke dannes mens den maksimale sukkerfor-gjæringen pågår er sannsynligvis den at melkesyrehydrogenasen ① har en høyere affinitet til pyrodruesyren enn dekarboksylasen. Det dannes derfor primært melkesyre. ②

S. diacetilactis er meget aktiv med hensyn til spalting av citronsyre og her får man også dannet acetoin mens sukkerfor-gjæringen pågår, se fig. 3.3.4.3 og 3.3.4.4. Det er intet som tyder på at S. diacetilactis og L. citrovorum spalter citronsyre på forskjellige måter. En må anta at det er konsentrasjonen av fri pyrodruesyre sammen med den aktuelle aktivitet på melkesyrehydrogenasen som bestemmer når dannelsen av C-4-forbindelsene skal skje.

S. diacetilactis spalter raskt EMP.



Figur 3.3.4.3. Citratforgjæring og syrningsforløp i henholdsvis D (DL)-syre og L-syre. Efter Leesment, 1968. Sv. Mej.tidn. 60(20):388.

Relativt innhold av acetoin og diacetyl +
 α -acetyl-melkesyre.

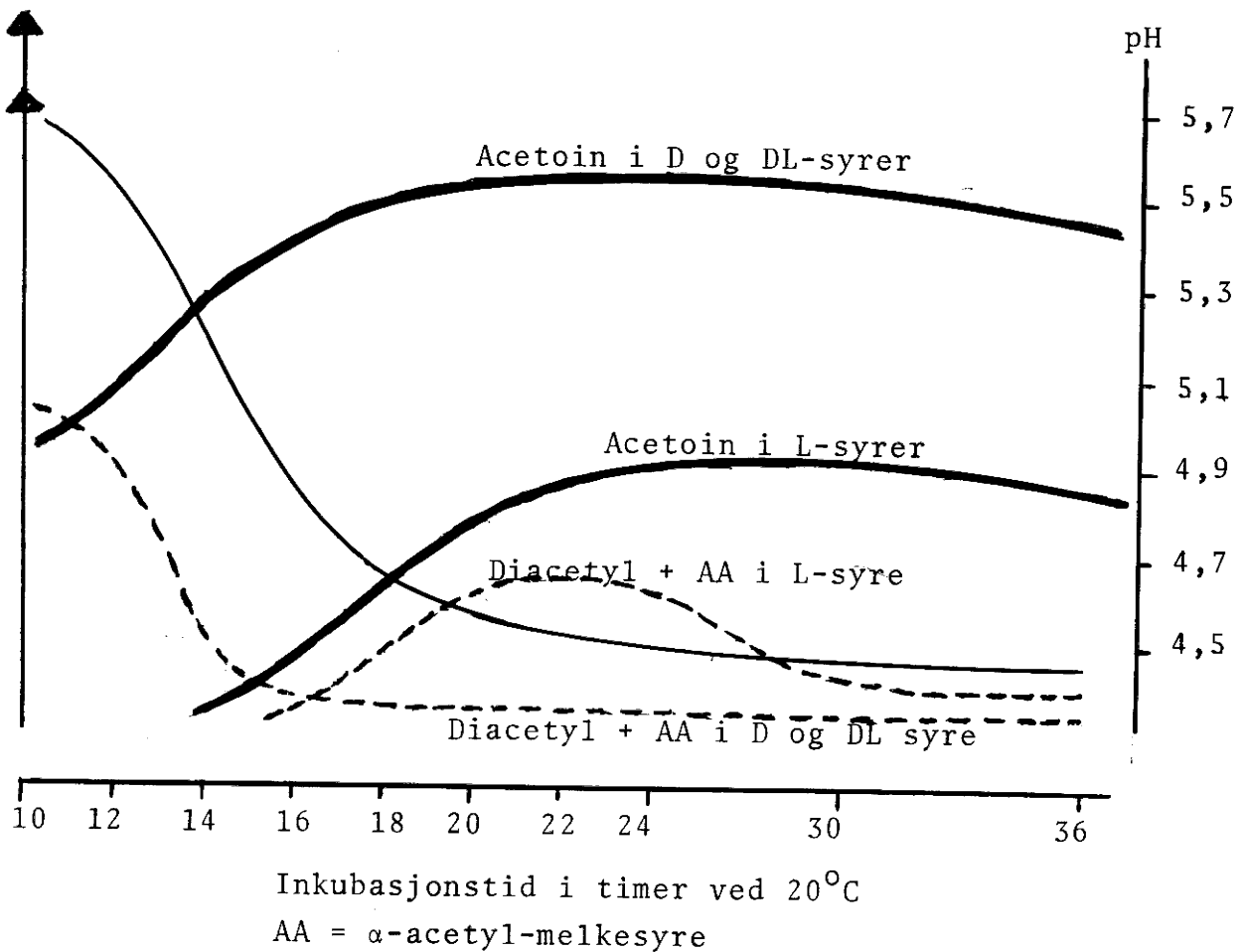


FIG.3.3.4.4. Sammenlikning av acetoin og diacetyl + α -acetyl-melkesyre i D og L syrer. Etter Anderson, 1964. Svenska Mejeritidn. 56(45):590.

Pyrodruesyre er et viktig mellomprodukt som danner utgangspunktet for en rekke synteseer (f.eks. lipider). Harvey og Collins (1963) mener at den pyrodruesyre som ikke er nødvendig for dannelsen av celledmateriale blir konvertert til C-4-forbindelser og at dannelsen av disse stoffene er en slags avgiftningsmekanisme som fjerner overskuddet av den intracellulære pyrodruesyre.

Hvordan dannes så C-4-forbindelsene ut fra pyrodruesyre ?
 Ved dekarboksyleringen av pyrodruesyren under aromagjæringen får en ikke fritt acetaldehyd slik som ved alkoholgjæringen. Dette er

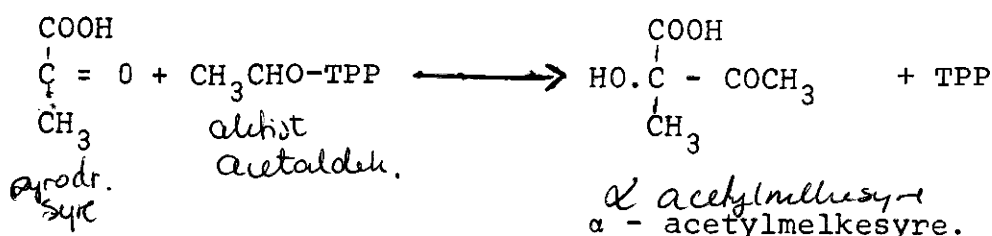
vist med tracerteknikk. En finner aldri igjen merket acetaldehyd som f.eks. diacetyl slik som det kunne være nærliggende å anta.

Ved dekarboksyleringen av pyrodruesyre får man derimot dannet acetaldehyd-tiaminpyrofosfat (TPP) såkalt aktivt acetaldehyd.

Ved kondensasjon av aktivt acetaldehyd med fritt acetaldehyd kan det dannes acetoin som ved videre oksydasjon gir diacetyl. Men denne dannelsesmåten av diacetylet kjennes imidlertid bare fra gjær og i dyrevev.

Når det gjelder melkesyrebakterier dannes acetoin på følgende måte:

Aktivt acetaldehyd kondenserer med pyrodruesyre til α -acetyl-melkesyre:

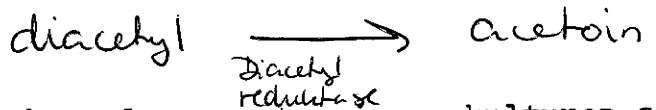


Ved dekarboksylering av α -acetyl-melkesyre fåes CO_2 og acetoin. En rekke mikroorganismer fører α -acetyl-melkesyre-dekarboksylase, bl.a. Leuconostoc. Ved oksydativ dekarboksylering antar en at det også kan dannes diacetyl.

I følge Speckman og Collins (1968) kan hverken α -acetyl-melkesyre eller acetoin være moderstoffet for diacetyl da hverken Leuconostoc eller S.diacetilactis har enzymer som katalyserer en oksydasjon av acetoin til diacetyl. I modellforsøk med disse mikroorganismene i et pyrodruesyre-manganaktivt-acetaldehyd-system viste det seg at diacetyl bare ble dannet dersom acetyl-CoA ble tilsatt i blandingen. Disse forskere hevder derfor at diacetyl primært dannes ved en kombinasjon av acetyl-CoA og $\text{CH}_3\text{CO.TPP}$.

På figur 3.3.4.4 ser en at for D- og DL- kulturen ~~øker~~ acetoininnholdet når α -acetylmelkesyre og diacetylinnholdet avtar. For L.-kulturen derimot øker α -acetylmelkesyreinnholdet og diacetylinnholdet sammen med acetoininnholdet under første del av gjæringsfasen (14-22 timer). Dette kan indikere noe forskjellig dannelsesmåte for diacetyl i D- og L-kultur.

Diacetyl-reduktase er påvist hos en rekke arter mikroorganismer inbefattet flere stammer *S. diacetylactis* og *L. citrovorum* og *dextranicum*. Dette ensymet katalyserer en irreversibel reduksjon av diacetyl til acetoin.



I følge svenske forsøk er det bare *Leuconostoc* i syrekulturen som kan redusere acetoinet videre til butandiol. Et høgt acetoininnhold er derfor karakteristisk for D-syrevekkere, tabell 3.3.4.1.

(Enkelte mikroorganismer kan bryte acetoinet ned til eddiksyre, vist bl.a. for mikrokokker og *S. faecalis*, men er ikke påvist for mikroorganismene i kulturen.)

Den spontane oksydasjon av alfa-acetyl-melkesyre avhenger av miljøets oksydasjonspotensial. Oksydasjonen øker under lufttilgang som f.eks. under kjerning. I et forsøk her ved meieriinstituttet fant vi at diacetylinnholdet i smør + kjernemelk lå vesentlig over innholdet av diacetyl i kjernefløten. Acetoininnholdet avtok derimot.

Tabell 3.3.4.2. Aromakomponenter i smør og kjernemelk i prosent av kjernefløtens innhold av de samme komponenter.

Diacetyl	151,6 %
Acetoin	93,9 %
Etanol	95,7 %
Aceton	93,2 %
Acetaldehyd	93,1 %

Tabell 3.3.4.1.

Acetoin og diacetylinnholdet (ppm) i 6 forskjellige kulturer ved start og etter en serie ompodninger med inkubasjon 16 timer ved 18°C.

Kultur	Ved start			Etter 10-20 ompodninger		
	Acetoin	Diacetyl	Forhold $\frac{A}{D}$	Acetoin	Diacetyl	Forhold $\frac{A}{D}$
1 (DL)	410	6	68:1	389	3,2	122:1
2 (DL)	269	11,6	23:1	168	3,6	47:1
3 (DL)	275	10,5	26:1	333	7,5	44:1
4 (DL)	192	4,2	46:1	218	2,9	75:1
5 (DL)	284	6,2	46:1	98	3,9	23:1
6 (L)	132	9,2	14:1	25	3,9	6,4:1

Etter Lode, 1974, upubl.

Bacillus polymyxa nyttes ofte til industriell produksjon av acetoin. Ved fremstilling av diacetyl blir acetoinet oksydert opp med Fe^{+++} .

Hvilke mengder av diacetyl kan man gjøre regning med å få i en god syrevekker ?

Som vi har sett kan en maksimalt få et 1/2 mol C-4- forbindelse pr. mol forgjært citronsyre. Dersom all citronsyre (molvekt 192) i melken (ca. 1,8 g pr. l) forgjæres til maksimal mengde diacetyl (molvekt 86) får en:

$$\text{Diacetyl g pr. l} = \frac{43 \cdot 1,8}{192} = 0,4$$

eller ca. 400 mg pr. l.

max mengde diacetyl

I praksis vil den aktuelle diacetylmengden selv i den mest aromatiske kultur ligge godt under 5 mg pr. l. Acetoininnholdet i kulturen kan derimot ofte ligge opp mot det teoretisk maksimale.

I D og DL syrevekkere er et acetoininnhold på 350 mg pr. l ikke uvanlig i fullt utvokste kulturer, mens en L-syrevekker gjerne har et acetoininnhold på ca. 100 mg pr. l. Lode (1972). Jfr. tabell 3.3.4.1.

Svenske undersøkelser har vist at i kulturer der S.diacetilatis er dominerende aromaproducent får en tidlig i gjæringsperioden et relativt høgt innhold av diacetyl, men dette reduseres raskt samtidig med at innholdet av acetoin øker og stabiliserer seg på et høgt nivå som vist i fig. 3.3.4.4. I L-syrer foregår aromagjæringen mer rolig, den starter på et senere tidspunkt. Hverken diacetylinnholdet eller acetoininnholdet blir så høgt som i D-kulturen. Det endelige diacetylinnholdet kan likevel bli høgre i en L-syre p.g.a. svakere reduksjonstendens. (Fig. 3.3.4.3.).

Lode, 1972. Studier over nokre bakteriologiske og biokjemiske eigenskapar hjå ulike typar syrekulturarar.

Melding nr. 159 fra Meieriinstituttet.

3.3.5. Kulturens CO₂-produksjon.

Leuconostoc produserer CO₂ både ved sukkerforgjæringen og ved citratforgjæringen. S.diacetilactis produserer CO₂ vesentlig ved citronsyreforgjæringen.

I ystingssammenheng har CO₂-produksjonen ved citratforgjæringen større interesse enn selve aromastoffdannelsen. Både S.diacetylactis og L.citrovorum forgjærer citratet etter samme skjema, men tidspunktet for citratforgjæringen er noe forskjellig hos de to bakterietyper, (fig.3.3.4.3.).

Hos S. diacetylactis kommer citratforgjæringen raskere igang, den skjer så å si parallelt med sukkerforgjæringen. I en D eller DL-syrevekker vil citronsyre være forgjæret ca. 6 timer tidligere enn i en L-syrevekker ifølge svenske forsøk (Leesment, 1968). Dette at gassproduksjonen under ysting kommer på et så tidlig tidspunkt er som vi vet svært uheldig. Grensen for den mengde CO₂ som kan løses i ostens vann overskrides, særlig hvis ikke osten har rukket å bli avkjølt, og revne hull blir gjerne følgen.

Hos Leuconostoc starter ikke citratforgjæringen opp før miljøets surhet har kommet ned under pH 5,0. Som vi har sett danner imidlertid Leuconostoc CO₂ både fra sukkerforgjæringen og fra citratforgjæringen. De fleste stammene har imidlertid en svak melkesukkerforgjæring og utgjør normalt bare en liten del av bakterietallet i kulturen. Størstedelen av den melkesyre som er dannet vil en derfor måtte gå ut fra stammer fra den homofermentative sukkernedbrytingen når en har med blandingskulturer å gjøre.

Selv om enkelte aktive stammer av Leuconostoc skulle kunne utvikle en større mengde CO₂ enn en diacetylactis-kultur, har tidspunktet for CO₂-dannelsen sannsynligvis vesentlig større betydning enn den absolutte mengde gass som dannes, da osten ved en langsommere utvikling kan kvitte seg med overskuddet.

Leesment, 1968. "Översikt över syrningskulturernas mikrobiologi. Svenska Mejeritidningen 60(20):388.

Leesment, (1967) har undersøkt utviklingen av CO_2 i en rekke forskjellige syrevekkere og disse undersøkelsene tyder på at CO_2 -utviklingen pr. celle er nokså stabil for *S.diacetilactis*, mens denne egenskapen er sterkt variabel for de forskjellige stammer av *Leuconostoc*. En skulle derfor ha større muligheter blant L-syrevekkere enn blant D-syrevekkere til å kunne velge ut en syrevekker som passer godt til det respektive ystingsformål. Fig. 3.3.5.1.

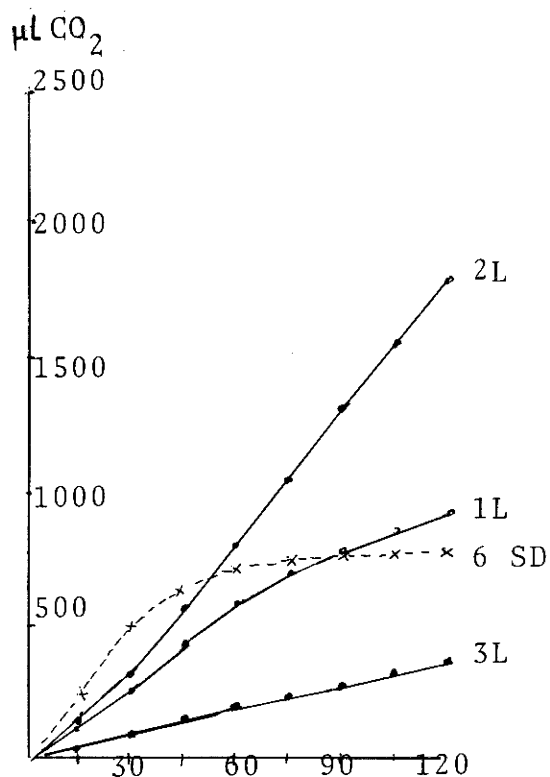


Fig. 3.3.5.1. Renkultur, stamme.

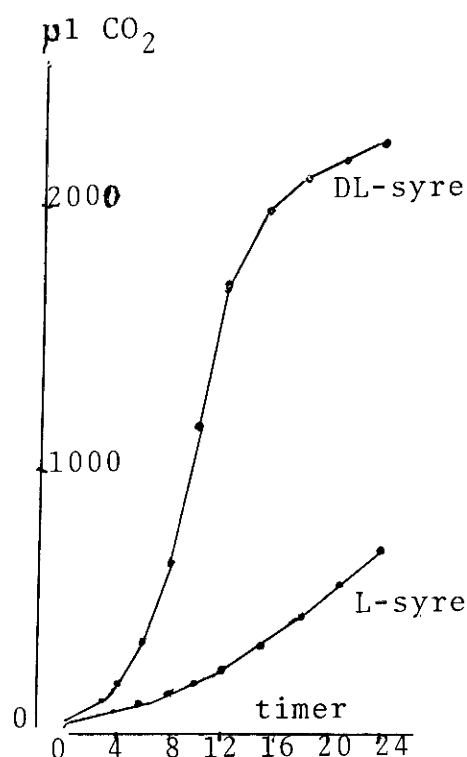


Fig. 3.3.5.2. Blandingskultur

En skal videre være oppmerksom på at i blandingskulturer der en har både *S.diacetilactis* og *Leuconostoc* vil førstnevnte dominere CO_2 -produksjonen som vist i fig. 3.3.5.2.

Leesment, 1967. Bestämning av gasbildningsförmågan hos syrningskulturer. Svenska Mejeritidningen 59(34):469.

Normalt vil antallet diacetylactis utgjøre fra 6-15 % av det totale celletallet i kulturen. (Lode upubl.) Det er diacetylactis' tendens til å komme i dominans i kulturen som gjør D-syrevekkerne så betenkelige ut fra et ystingssynspunkt. Jo større innholdet av aktive citratforgjærere er, desto kraftigere blir gassutviklingen, og med diacetylactis, på et tidlig tidspunkt. Eksempel på dominans av citratforgjæringen i kulturen er vist i tabell 3.3.5.1. Dersom dominansen skyldes S.diacetylactis skjer gassutviklingen på et tidlig tidspunkt.

Tabell 3.3.5.1. Innholdet av citratforgjærere i DL-kultur under fortløpende forplantning. Etter Lode (1971).

Citratforgjærere i % av totalantallet etter en serie forplantninger. 21°C, 1/2 % poding.

Etter forplantning nr.	Inkubert 18 timer.	Inkubert 22 timer.
Start	17	17
1	2	9
3	1	5
5	3	6
6	5	8
12	14	15
17	10	46
26	44	84
29	44	86
40	55	95

Jfr. også Anderson side 16.

3.4. Variasjoner i kulturens egenskaper.

En av de vesentligste egenskaper hos kulturen er at den er stabil i sine biokjemiske aktiviteter, - ikke minst når det gjelder kulturer for ysting.

Akkurat som for mer høgtstående individer er mikroorganismenes karakter bestemt av det arvestoffet de har i seg. De fundamentale biokjemiske egenskaper i cella er bestemt av dette arvestoffet. Endringer i arvestoffet kan som kjent skje ved mutasjoner (spontane endringer) og det synes som frekvensen av mutasjoner er relativt høy i bakteriepopulasjoner.

TRANSFORMASJON Det er også vist at arvestoffet (DNA) så å si kan diffundere inn i cella fra omgivelsene når det gjelder bakterier (transformasjon). En transformasjon kan induseres ved at levende celler av én type mikroorganismer blandes med DNA (arvestoff) som er frigjort fra en annen stamme forskjellige, men nær beslektede mikroorganismer. Ved Hillerød hevdes det å være utført forsøk med transformasjon av diacetylactis' aroma-produserende egenskaper til S.lactis.

KONJUGASJON Videre er det for enkelte bakterietyper vist at en direkte celle til celle kontakt (konjugasjon) kan resultere i utskifting av arvestoffet. Dette blir nærmest å sammenlikne med en sexuell utveksling av arvestoff. Fenomenet har bl.a. vært påvist hos coli, salmonella og pseudomonas.

TRANSDUKSJON En tredje måte endringer i cellenes arvestoff kan skje på, er ved hjelp av bakteriofager (transduksjon), og dette er sannsynligvis den hyppigste årsak til endringer i cellenes arvelige egenskaper. Hvordan dette foregår skal vi komme tilbake til senere.

Individet vil også i stor grad være preget av det miljøet det lever i. Dette gjelder også for bakterier. Alt etter hva slags substrat de vokser i og hvilken pH, temperaturer og redoxpotensial det har, kan kulturen variere i sine stoffomsetninger. Dette

Substrat
pH
temp
red/ox pot

kommer av at mange mikroorganismer er utstyrt med flere sett enzymsystemer og miljøet vil da være bestemmende for hvilke enzymer som skal settes i aktivitet eller vil være mest aktive i kulturen. Endringene i aktiviteten skyldes altså ikke endringer i cellenes arveanlegg. (En sier at samme genotype har forskjellige fenotype).

Ved systematiske ompodninger på substrater eller miljøer som kanskje ikke er helt optimale sett ut fra bakteriens næringskrav, kan man håpe på at det oppstår mutasjoner som har bedre evne til å tilpasse seg dette bestemte substrat eller miljø. Slike individer vil da etter hvert komme til å dominere celledallet i kulturen og en kan på denne måten være heldig å komme fram til en kultur som egner seg bedre til sitt spesialformål enn den opprinnelige. (Eksempel på dette kan være selektering av bakterier som tåler en høg etter-varmingstemperatur under ysting eller som er mer salttolerante enn gjennomsnitts-individet).

De fleste mutanter har imidlertid dårligere egenskaper enn opphavet og vil være ubrukelige som kulturorganismer. En kultur som holdes under betingelser som avviker mye fra de optimale vil vanligvis svekkes.

I en kultur som består av flere typer mikroorganismer i blanding vil spørsmålet om symbiotiske og antibiotiske effekter mellom bakterietypene også være av betydning for stabiliteten i kulturen. Enkelte stammer av *S. lactis* produserer som vi vet polypeptidet Nisin, som har en sterk antibiotisk virkning mot andre *lactis*-stammer og mot en rekke andre bakterier. En må vel imidlertid kunne se bort fra at det skulle eksistere nisinprodusenter i syrekulturer levert fra syrelaboratorier, like- så må en vente at de stammene, som syrevekkelaboratoriene setter sammen i kulturen, er grundig prøvet og funnet å passe sammen.

Symbiotisk effekt har en mellom *Leuconostoc* og *S. lactis/cremoris*-gruppen i kulturen. *Leuconostoc* vokser bedre i blanding med *S. lactis/cremoris* enn i renkultur. I renkultur vil den heller ikke produsere nevneverdig diacetyl da pH ikke blir lav

nok til at citronsyre-gjæringen kommer i gang.

Dette balanseforholdet mellom Leuconostoc og lactis-cremoris-gruppen i kulturen vil lett kunne forskyves i den ene eller den andre retningen når kulturen har vært forplantet i lengre tid på meieriene. I DL-syrevekkere har en erfaring for at diacetyl-actis har lett for å bli dominerende.

3.4.1. Genetisk betingete variasjonsårsaker.

3.4.1.1. Bakteriofager.

Da bakteriofager ikke bare er istand til å endre forskjellige arvelige egenskaper hos cellene i kulturen, men hyppigst er årsak til en massiv bakteriedød hos de mottakelige stammer må vi se litt nærmere på dette fenomenet.

En bakteriofag er et bakterievirus som angriper spesielle mottakelige stammer. Sannsynligvis har enhver celle sitt homologe eller motsvarende virus. Hva er så et virus?

En kan vel si at et virus er en mikro-partikkel som i alt vesentlig består av en del av det arvestoffet eller DNA som finnes i den mottakelige celle, i seg selv dødt materiale, men dette DNA har en slik konstitusjon at det når det kommer inn i sin vært-organisme, enten kan påvirke cellen til å produsere nye virus (eller fag-partikler) eller det kan etablere seg i cellen som en "profag". I første tilfelle vil cellen gå til grunne og det vil frigjøres ca. 100 nye fagpartikler som i sin tur kan angripe nye celler. Dette vil, som en skjønner, ha drastiske følger for en kultur.

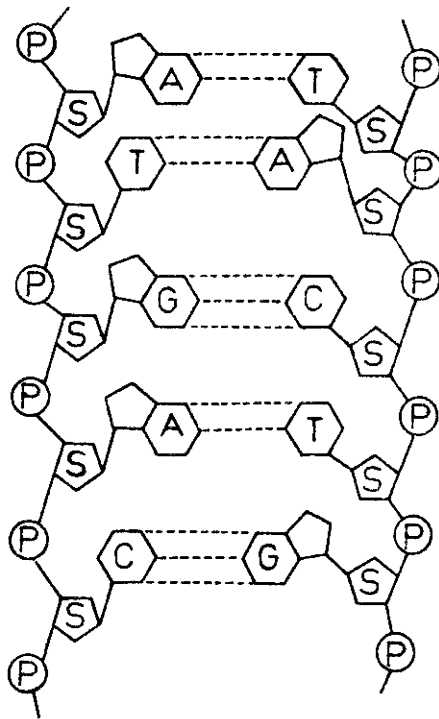
I det andre tilfellet, når DNA etablerer seg som profag, skjer det tilsynelatende ingen ting med cellen, men bare tilsynelatende. Cellen har blitt resistent mot angrep fra samme type fag. Videre har Fag-DNA gitt cellen den arvelige egenskap at den eller dens datterceller når som helst kan begynne å produsere nye fagpartikler ved selv å løses opp. Disse har blitt såkalte lysogene celler. Dette er imidlertid ikke det normale. Fag-DNA har etablert seg sammen med bakteriens DNA og formerer seg i takt med cellenes ^{normalt} formering.

Celler med slikt bakteriofag-DNA i seg viser også små forandringer i sine livsfunksjoner, det kan ytre seg ved annen form og farge på bakteriekoloniene på fast substrat, tap eller tilføring av nye enzymer, produksjon av toksiner o.s.v. Sykdommen difteri skyldes for eksempel et toksin som blir produsert av en lysogen difteriebakterie. Difteriebakterier uten profag er helt ufarlig.

Profag-fenomenet kan forklare mange av de endringer som forekommer i syrekulturens stabilitet.

For å forstå mekanismen i det som skjer må en kjenne oppbyggingen av DNA-molekylet. DNA står for Deoxyribo nucleie acid. Som navnet antyder inneholder det ribose og forekommer i nucleus.

Mikromolekylet av DNA består av fosforsyre + pentose + en av fire forskjellige nitrogenholdige ring-strukturer, nemlig adenin, guanin, cytosin e. tymin. Fig. 3.4.1.1.



Figur 3.4.1.1. Det "trappelignende" DNA molekylet fremstilt i diagram. (P=fosfat, S=deoxyribose, A=adenin, T=thymin, G=guanin, C=cytosin).

Hvert mikromolekyl bindes sammen over fosforsyren til lange kjeder på opptil 20 000 småmolekyler. Alt etter hvilken nitrogenbase som inngår i småmolekylene (nucleotidene) vil makromolekylet endre karakter, og det er kombinasjonene av baser i tre og tre mikromolekyler (triplets) som viser seg å være den kode som arvestoffet benytter seg av.

Triplettene er på en måte bokstaver i et alfabet med $4 \times 4 \times 4 = 64$ bokstaver. De danner "mening" når de blir satt sammen på helt bestemte måter.

DNA forekommer i cellen vanligvis som en lang tvinnet dobbeltråd. P.g.a. spesielle egenskaper ved nitrogenbasene vil det ved celledeling, etter en forutgående adskillelse av de to tråder, bygges opp nukleotider langs begge de adskilte trådene i nøyaktig samme rekkefølge som det opprinnelige. Dette forklarer arvets konstans.

Ved at cellen tilføres små DNA-fragmenter med "gal"-mening fra bakteriofager kan man lett forstå at fagen bringer forstyrrelse i cellens stoffskifte.

Bakteriofagenes form, størrelse og konstitusjon går fram av figur 3.4.1.2.

Bakteriofagpartiklen har et klubbeliknende utseende som består av et sekskantet hode fylt med et langt DNA-molekyl og en hale med slire og endeflate. Dette siste er fagens angrepsredskap, Total lengde er ca. 200 m μ og vekten er $5 \cdot 10^{-16}$ gram .

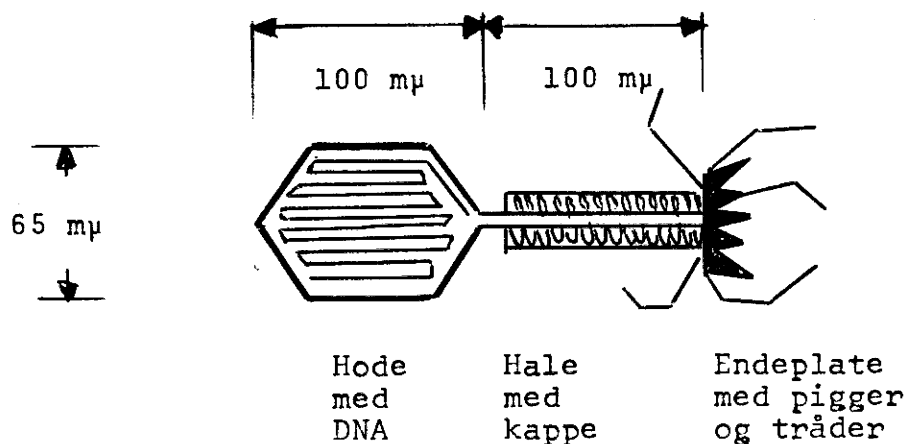
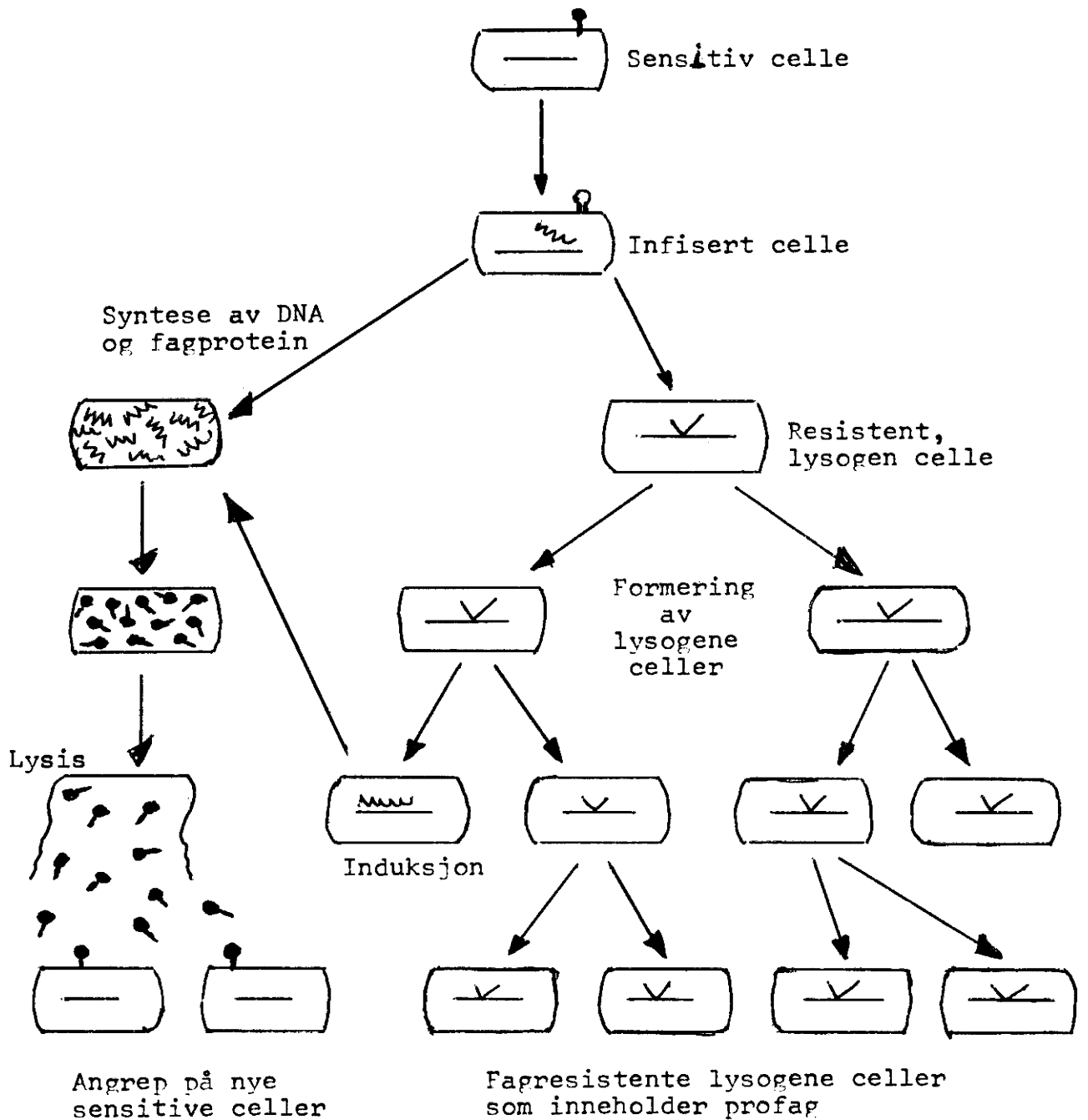


Fig. 3.4.1.2. Bakteriofagpartikkelen skjematisk.



Figur 3.4.1.3. Stadier i fagsyklus.

Når fagpartiklen kommer i kontakt med en sensitiv celle fester den seg til cellen med halens endeflatestruktur. Aminosyrefrekvensen i denne proteinstrukturen må passe til strukturen i celleveggen dersom den skal kunne festne. Dette forklarer fagenes strenge spesifitet.

Når fagen har festnet til cellen svekkes celleveggen av enzymliknende substanser i basalflaten, sliren trekker seg sammen, så hale-røret penetrerer celleveggen og fag-DNA sprøytes inn i cellen (fig.3.4.1.3). Ett av to ting kan nå skje:

- a) Er fagen virulent overtar den øyeblikkelig kommandoen over cellens stoffskifte og får den til å syntetisere fag-DNA + partikkel-protein (den latente periode). Etter ca. 12 min. begynner de første fagpartiklene å ta form, men først etter ytterligere 15 min. kan det påvises virulente fager. Ca. 40 min. etter infeksjon er alle fagpartiklene "modne", celleveggen løser seg opp og det frigjøres fra 70-200 nye fagpartikler. I en én-stammekultur vil utviklingen i kulturen da kunne skje slik som vist i figur 3.4.1.4.

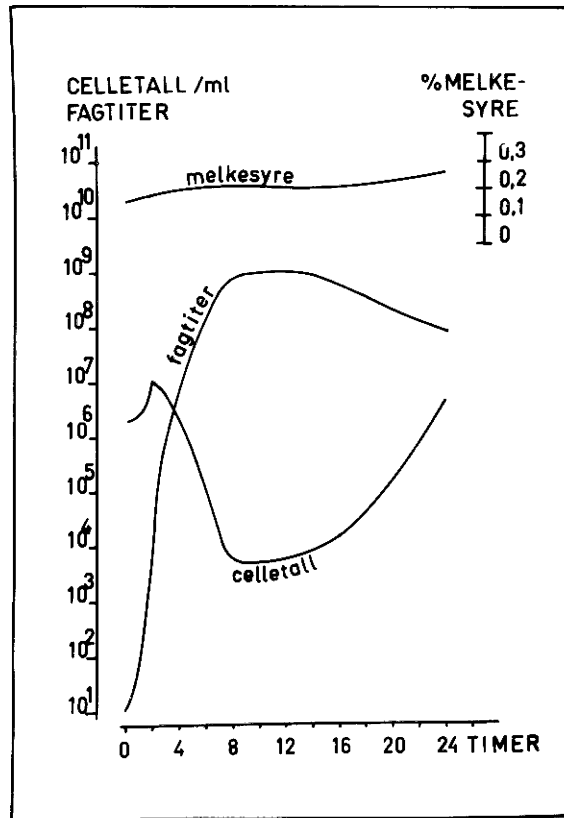


Fig. 3.4.1.4. Celletall og syrningsforløp i faginfrisert syre. Fagtiter er den største fortyning en kan gjøre med en prøve og fremdeles kunne påvise fager.

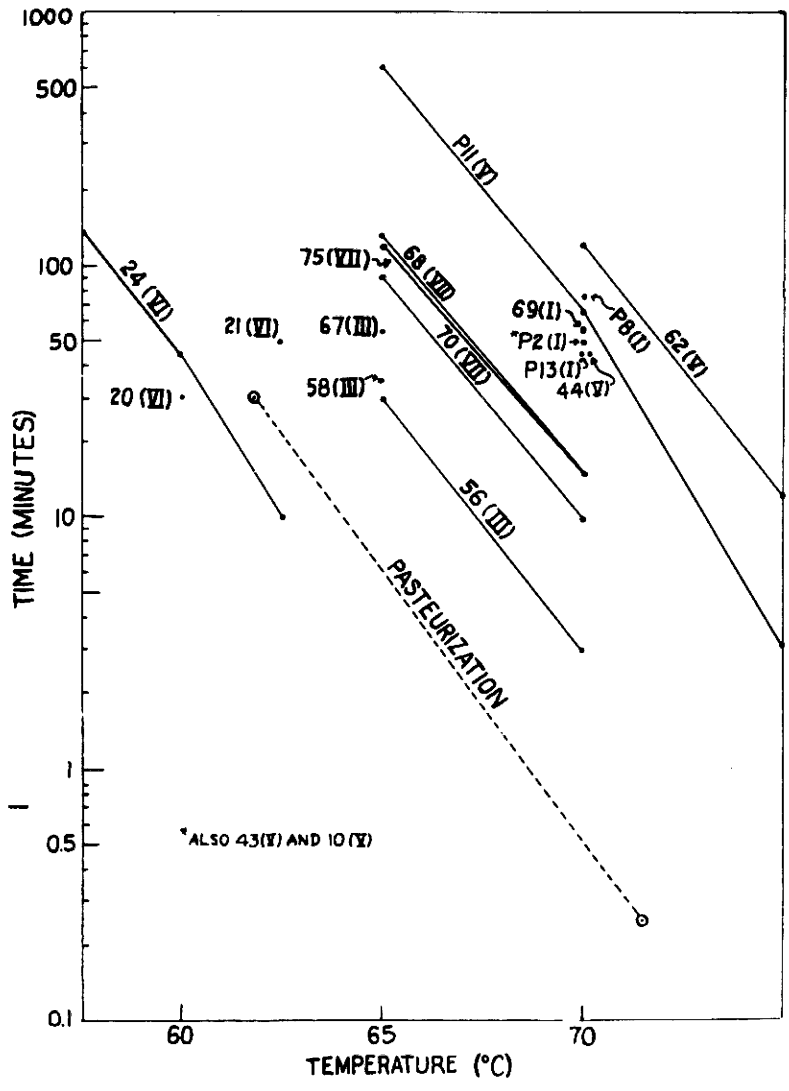
b) Er fagen temperert d.v.s. avirulent etablerer fag-DNA seg som profag sammen med cellens DNA og man får en lysogen fagresistent celle, d.v.s. en celle som bærer i seg muligheter til å gjennomgå lysis. Profagen kan nemlig bli virulent, enten ved bestråling etc. eller også spontant. Det siste skjer sjelden, men i lysogene kulturer kan fager alltid påvises p.g.a. induksjon i et fåtall av de lysogene celler. Når dette skjer vil fagen kunne ta med seg arvestoff fra vertsorganismen og ved temperert infeksjon i ny celle overføre de egenskaper som er knyttet til dette DNA til den nye vertscella, slik som tidligere omtalt.
brukt i gen teknologier.

Bakteriofager som partikler forekommer over alt. P.g.a. størrelsen spres de lett i luft og da de er ufølsomme for inntørking, er luftinfeksjon vanlig. La ikke myserester tørre inn ! Fagpartiklene er mer varmeresistente enn sine vertsorganismer. Vanlig pasteurisering er ikke tilstrekkelig, men 20 min. ved 75°C synes å holde. Fig. 3.4.1.5. Hypokloritt er meget aktivt mot bakteriofager og sprayforstøvning av dette i faginfiserte lokaler har vist seg svært effektivt. (20 ml hypokloritt/100 m³ luftrom). Optimalbetingelsene for fagan-grep har en i melka ved 30-37°C og pH 6,5 (Ystekaret I).

Aktiviteten avtar sterkt ned mot pH 5,0. Da fagpartiklene er ubevegelige, vil all infeksjon stanse i koagulert melk. Det samme vil skje i løpelagt melk. Rask syrning og tidlig løpning av karet er derfor å anbefale.

"Rotasjon" av kulturer med forskjellige fagspesifitet er en annen metode som nyttes for å hindre opphopning av bakteriofager i ysteriene. En har opptil 8 kulturer som går på rundgang.

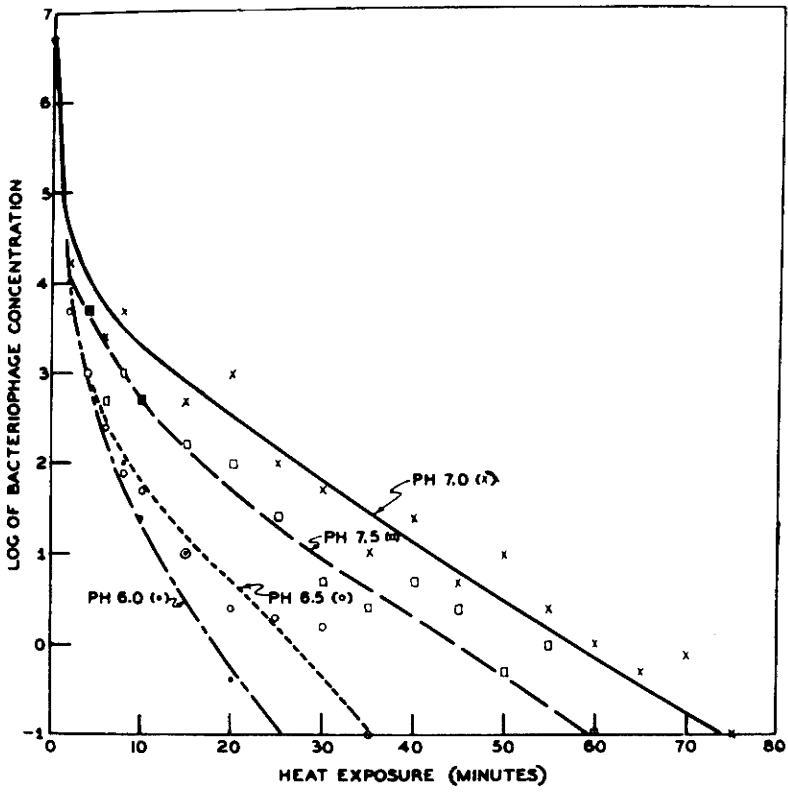
For at fagpartiklenes angrepsmekanisme skal virke må substratet inneholde kalsium-joner. Binder man disse med f.eks. oksalsyre etc. kan men etter gjentatte forplantinger på slik melk, befri kulturen for fagan-grep, men dette er neppe aktuelt å utføre i praksis.



Figur A viser endel bakteriofagstammers (lactiofager) varmetoleranse.

Fig. 3.4.1.5.

FIG. A. Time-temperature relationships for complete inactivation of several bacteriophage strains.



Figur B viser den innvirkning pH har på varmetoleransen hos stammen P 8(I) ved 70° C.

Illustrasjonen er hentet fra arbeider av:
 Wilkowske, H.H. et al 1954.
 Heat Inactivation of Bacteriophage Strains Active Against Lactic Streptococci.
 Applied Microbiology 2(5):250.

FIG. B. Influence of pH on the heat inactivation of bacteriophage strain P8 at 70°C.

3.4.2. Miljømessig betingete endringer i kulturen.

Substratet er en meget viktig del av mikroorganismenes miljø. Vi skal derfor se litt nærmere på melken som substrat for syrningsorganismene.

Temperaturen og andre miljøfaktorer vil bli diskutert i forbindelse med syrens fremstilling.

3.4.2.1. Syremelken.

3.4.2.1.1. Vekstfaktorer.

Melkesyrebakteriene er heterotrofe organismer som bygger opp sin celle-substans av organisk materiale. Energikilden er melkesukkeret. I normal melk forekommer vanligvis alle nødvendige næringsstoffer for syrekulturen.

Tilgangen på nitrogen-næring (peptider og aminosyrer) er gjerne minimumsfaktorer og ofte årsak til variasjon i veksten hos forskjellige melkesyrebakterier, *Leuconostoc*-artene har f.eks. vanskeligere for å tilfredsstille sitt nitrogenbehov enn *lactis-cremoris*-artene.

Melkens peptidinnhold og veksten av syremelkens bakterier har vært undersøkt av flere forskere (Anderson, Parker, Elliker) og de forskjellige stammer viser en intensivert syredannelse med øket peptidinnhold.

Aminosyrebehovet veksler sterkt hos disse bakteriene, ikke bare mellom artene, men også fra stamme til stamme innen arten. Både *Leuconostoc* og *Streptococcus* må ha aminosyrene valin, leucin, isoleucin, arginin og histidin.

Svært mange av de undersøkte stammer synes også å ha et absolutt behov for glutamin og prolin.

Anderson, A.W. & Elliker, P.R. The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. I Growth in a synthetic medium. J.Dairy Sci. 36, 161-167, 1953.

Leuconostoc har et absolutt behov for glutaminsyre, lysin, cystein, fenylalanin, tyrosin og tryptofan.

Alanin og metionin er essensielle for streptokokkene, men ikke for Leuconostoc.

Alle de nødvendige aminosyrene forekommer i normal melk.

Av vitaminer trenger samtlige syrevækkerorganismer niacin, pantotensyre og biotin.

Leuconostoc trenger dessuten riboflavin, pyridoxin, tiamin og folinsyre. Enkelte stammer krever også vitamin B₁₂.

Vitaminbehovet til S. cremoris er noe mer omfattende enn S. lactis. Av andre vekstfaktorer vet vi at Pediococcus trenger folinsyrederivatet leukovorin for å kunne vokse.

Tenker vi på aromagjæringen er det absolutt nødvendig at melken har et normalt innhold av citronsyre. Her i Norge er det ikke gjort noen systematisk undersøkelse over melkens citronsyreinnhold, men amerikanske og svenske undersøkelser tyder på at dette varierer lite.

I amerikansk melk er det funnet et midlere citronsyreinnhold på 0,18 % og i svensk melk ligger citronsyreinnholdet på mellom 0,14 og 0,15 %. Dette gjelder blandingsmelk. 38 analyser av ystemelk fra Nærbø meieri tatt hos oss i tiden 29.3 - 15.8 1973, viser et innhold av citronsyre på mellom 0,17 og 0,22 %. I melk fra enkeltdyr kan citronsyreinnholdet variere mellom 0,07-0,33 %.

I samlemelk må en gå ut fra at det under normale forhold vil være nok citronsyre tilstede og noen ekstra tilsetning av citrosyre til syremelken synes ikke å ha så mye for seg. En får bl.a. en altfor sterk CO₂ utvikling i kulturen.

Essensielle metallsalter for bakterienes vekst inngår delvis i de organiske forbindelser som bakteriene bryter ned, andre igjen kan opptas direkte fra omgivelsene.

For at *Leuconostoc* skal kunne forgjære citronsyre trengs som nevnt mangan (til 6-fosfoglucosyredehydrogenasen).

I følge danske undersøkelser (Overby, 1966) varierer manganinnholdet i melken fra 5,5 til 28,7 mikrogram pr. l. Manganet må imidlertid foreligge i en fri form før *Leuconostoc* skal kunne gjøre nytte av det.

Tilsetning av
Manganmangel kan forekomme i melken om vinteren. 1 mg $MnSO_4$ pr. l melk kan forsøkes i slike høve. I blandingskulturer som både inneholder *diacetylactis* og *Leuconostoc* som aromadanner er det gunstig med en viss mangantilsetning til melken forat ikke *diacetylactis* skal dominere kulturen både tallmessig og i aromagjæring. En får da som før nevnt en yoghurtliknende smak på kulturen som skyldes opphopning av acetaldehyd. *Leuconostoc* reduserer innholdet av CH_3CHO og stimuleres også i veksten av dette.

Melkens innhold av vekstfaktorer har sammenheng med fôringen av kua og variasjoner kan derfor forekomme gjennom sesongen.

ikke helt rett → Sesongvariasjoner i melkens substrategenskaper er da også registrert ~~id~~ ~~et~~ ~~vintermelka~~ ~~vanligvis~~ ~~synes~~ ~~å~~ ~~egne~~ ~~seg~~ ~~best~~ ~~til~~ ~~syremelk~~. I aseptisk melket melk kunne imidlertid ikke Ritter (1949) finne noen sesongvariasjon på melkas substrategenskaper.

I forsøk med 17 stammer mesofile streptokokker kunne heller ikke Auclair (1959) med sikkerhet påvise sesongvariasjon, hverken på leverandørmelk eller samlemelk. Eventuelle registrerte sesongvariasjoner i melkens substrategenskaper mener han derfor må skrive seg fra stoffer som dannes av melkens mikroflora under transport og lagring.

Det foreligger også endel forsøk over lactasjonsstadium og melkens substrategenskaper. Ritter (1949) fant at lactasjonsstadium, ernæring o.l. miljøfaktorer hadde varierende virkning på melkens

Overby & Vigh-Larsen, 1966. Investigations on the Manganese Content of Milk and its Influence on the Starter. Den kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, 1966, side 101.

Ritter, 1949. Die disposition der Milch. Annuaire Agricole de la Suisse, side 595.

substrategenskaper alt etter hvilke testbakterier som ble nyttet. Mastittmelk kunne for eksempel vise både vekstfremmende og veksthemmende egenskaper alt etter art av infeksjon og i hvilken grad melken var omdannet.

De enkelte stammer av melkesyrebakterier opptrer svært forskjellig på de samme melkeprøver. Unormal melk, f.eks. sinamelk må en unngå å bruke til syremelk.

3.4.2.1.2. Hemningsstoffer.

I praksis kan det være vanskelig å vite om dårlige substrategenskaper på melk skyldes mangel på vekstfaktorer eller om den inneholder hemningsstoffer.

Visse hemningsstoffer uten at vi kan spesifisere dem nærmere forekommer relativt ofte i melk.

Wolin og Kosikowski (1958) fant at melk fra enkelte kyr ga klare hemningssoner på agarplater tilsådd med *B. subtilis*. I slike tilfeller er det klart at en har med aktive hemningsstoffer å gjøre. Dersom små tilsetninger av suspekt melk til et på forhånd normalt substrat, medfører dårligere vekstbestingelser for kulturen, må det skyldes hemningsstoffer. I praksis viser dette seg oftest ved en langsom syrning i kulturen. Syredannelsen kan bli så nedsatt at melken ikke koagulerer selv etter lang inkubasjon. Vanskelighetene med syrningstreg melk er ikke bare begrenset til syrefremstillingen, men gjør seg kanskje sterkest gjeldene i ystekaret.

Av hemningsstoffer har en i praksis en lang rekke som kan komme på tale. For å lette oversikten kan en her skille mellom:

- a. De originære hemningsstoffer som finnes i melken.
- b. Stoffer som dannes av melkens mikroflora.
- c. Hemningsstoffer som er tilført melken.

Auclair, 1959. Symposium on Starter Cultures, Alnarp 1961.

Wolin & Kosikowski, 1958. Formation of bacterial inhibitory zones in whey agar by raw milk. *J. Dairy Sci.* 41(1):34.

Melking → lagring → transport → lagring → foredling

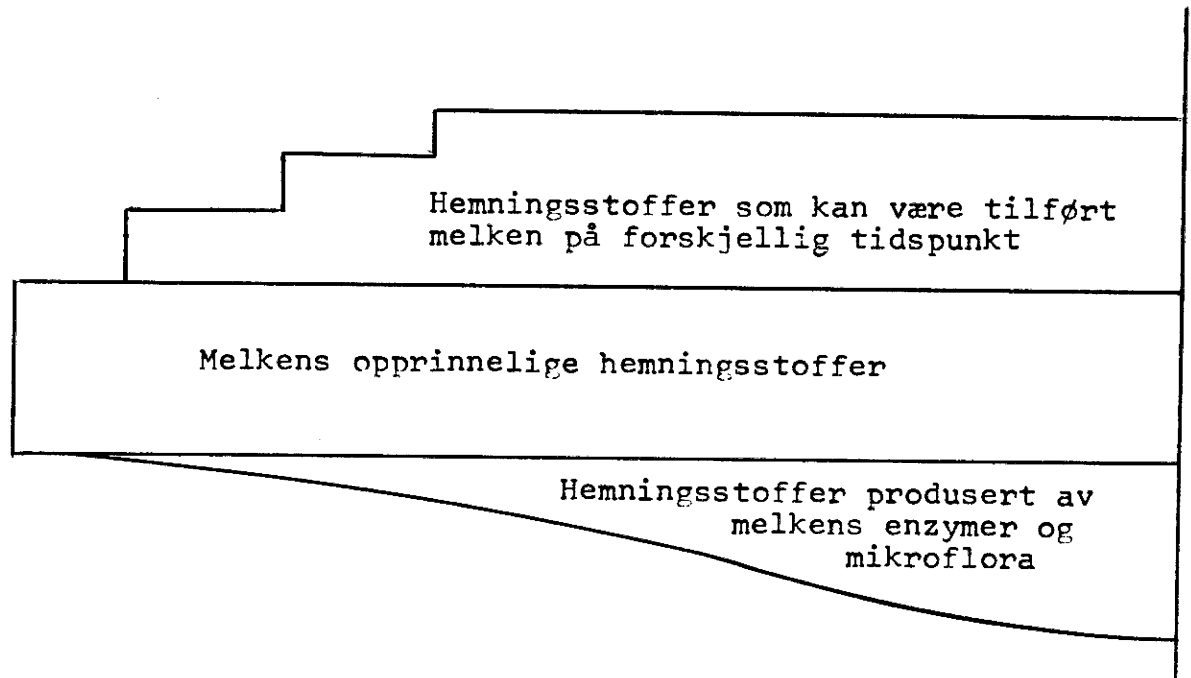


Fig. 3.4.2.1.2. Kilder for vekshemmende stoffer i melk.

3.4.2.1.2.1. Melkens bakteriehemmende egenskaper.

I likhet med blod og andre kroppsvæsker har melken bakteriehemmende egenskaper. Bakteriene kommer vanligvis ikke til utvikling i juret, og nymelket melk er ikke noe godt substrat. Fersk melk er dårlig ystemelk. Særlig har colostrum utpreget baktericide egenskaper. En vet at de kvite blodlegemene i melken spiller en aktiv rolle, men er ikke den eneste årsaken. En har også andre baktericide prinsipper, så som bakteriolyserende stoffer, oksydative enzymer etc.

De bakteriehemmende egenskaper varer lengst i aseptisk melket melk og når melken oppbevares kald.

Noen av hemningsstoffene er termostabile mens andre er termolabile. Tidligere mente en f.eks. at vanlig lavpasteurisering var tilstrekkelig til å inaktivere melken originære innhold av lipase. Nyere amerikanske og svenske undersøkelser viser imidlertid at termostabiliteten er større enn hva man har trodd.

Sjøstrøm (1960) varierte holdertiden fra 3-120 sek. og undersøkte hele temperaturområdet oppover til 100°C, men fant ikke i noe tilfelle null lipaseaktivitet. Umiddelbart etter pasteuriseringen fikk en riktignok lave verdier ved pasteuriserings-temperaturer over 70°C, men etter et døgn's henstand kom en liten del av lipaseaktiviteten tilbake.

Vanlig pasteurisering må imidlertid stort sett betraktes som tilstrekkelig for å ødelegge melkens originære lipaser.

Av andre originære hemningsstoffer som en med sikkerhet kjenner i melk er kanskje det av Jones og Simms (1930) funne Lactenin best kjent. Senere forskere har funnet at det her dreier seg om flere forskjellige inhibitoriske stoffer. Ett påvirker agglutinerings- og bakterier, et annet har lactoperoksydase-liknende egenskaper.

Auclair, (1959) viste at hemningen hos melkesyrestreptokokker skyldtes agglutininene som ble adsorbent av de mottakelige stammer. Bakterieklyngene som dannes vil i helmelk følge med i fløteavsetningen. De ikke mottakelige stammer finnes derimot jevnt fordelt i melka. I magermelk vil de agglutinin-ømfintlige stammer agglutinere og sedimentere. Sedimentet består av koagulert kasein som omslutter bakteriene. Ved laboratorieforsøk har en demonstrert at agglutininene ikke viser hemningseffekt dersom melken koaguleres med løpe eller tilsettes agar.

Sjøstrøm, 1960. Fettspjålkning i mjølk och mejeriprodukter. Nordisk Mejeri-Tidsskrift 26(3):38.

Jones & Simms, 1930. The bacterial growth inhibitor (Lactenin) of milk. J.Exp.Med. 51:327.

Auclair & Portmann, 1959. Action inhibitrice des lactenines sur les streptocoques lactiques des Levains de fromagerie. 15.int.Meierikongress 2:580.

3.4.2.1.2.2. Hemningsstoffer produsert av melkens mikroflora.

Jo større innholdet av mikroorganismer er i melken desto større er muligheten for å ha bakterier tilstede som kan produsere hemningstoffer for syrningsorganismene.

Dersom fettkulemembran^{en} ikke er skadd vil vanligvis melkens normale lipaseinnhold ikke være årsak til harsk smak, men med et høgt innhold av lipolytiske mikroorganismer kan dette være et aktuelt problem, spesielt i den situasjon en har nå med mange gårdstanker. Galt monterte reliseranlegg og litt hårdhendt røring gir straks utslag i melkens innhold av frie fettsyrer. Dette kan lett bli så høgt at det virker veksthemmende på melkesyre-streptokokkene.

En harsk melk vil gjerne komme i første klasse i reduktaseprøven, men vil være flytende i gjærreduktaseprøven.

Hemningsstoffer produsert av melkens mikroflora er som regel relativt termostabile. Selv om de bakteriene som har vært opphav til disse hemningsstoffer blir tilintetgjort ved pasteurisering, vil melken fremdeles være et dårlig substrat.

Et typisk eksempel på et slikt termostabilt hemningsstoff er det tidligere omtalte nisin (isolert av Mattick og Hirsch) som produseres av såkalte hemmende stammer av *S.lactis* og som er et polypeptid med mol-vekt på ca. 7000. Det er meget giftig i ren tilstand. Foruten å hemme melkesyrebakteriene, har det også høg antibiotisk effekt overfor mange patogene mikroorganismer.

Et annet hemningsstoff, diplokokksin produseres av enkelte *S. cremoris*-stammer.

Det er også vist (Cox & Whitehead) at visse colibakterier kan produsere hemningsstoffer som er meget aktive overfor syrevekkerorganismer.

Mattick & Hirsch, 1947. Further observations on an inhibitory substance (nicin) from lactic streptococci. Lancet 253:5.

Cox & Whitehead, 1931. The influence of other bacteria on the production of acid by lactic streptococci in milk. J. Dairy Res. 2:164

3.4.2.1.2.3. Hemmingsstoffer som kan tilføres melken.

En betydelig større rolle i praksis spiller nok de forekomster av antibiotika i melk som skriver seg fra dyr som har blitt behandlet med denslags preparater i forbindelse med jurbetennelse. I årene etter den 2. verdenskrig har antibiotika som penicillin aureomycin, chloromycetin, terramycin og andre blitt mer og mer alminnelig nyttet i kampen mot jurbetennelsen.

Av disse stoffer er det forskjellige typer av penicillin som har vært mest anvendt. Mikroorganismene i syrekulturen er svært følsomme overfor slike antibiotika, og i de første dagene etter behandlingen kan melka inneholde disse stoffer i en mengde som er tilstrekkelig til å stoppe syrningen helt. Melk fra dyr som er behandlet med antibiotika bør derfor holdes tilbake fra meieriene 3-4 dager etter siste behandling. γ .fr. detaljerte regler fastsatt av Meieribrukets Sentralstyre.

De forskjellige syrevekker-organismene viser en noe forskjellig følsomhet overfor penicillin. Enkelte arter som *S. thermophilus* hemmes ved så lave konsentrasjoner som 0,02 mg/l. Vanligvis er *S. lactis* litt mere resistent enn *S. cremoris*. *Leuconostoc* tåler vesentlig mer enn streptokokkene i blandingssyrevekkeren.

Kan g. ^{va} nytte at dette ved syringshemm. I følge I.von Timroth (1953) og Storgårds (1962) er toleransen for følgende mikroorganismer, tabell 3.4.2.1.2.3. :

	Penicillin, merkbar hemning ved	mg/l av penicillin G
<i>S. lactis</i>	0,25-0,5 i.e./ml	0,15-0,30
" <i>cremoris</i>	0,10-0,25 - " -	0,06-0,15
" <i>thermophilus</i>	0,025-0,05- " -	0,015-0,03
" <i>faecalis</i>	0,5-5,0 - " -	0,3-3,0
<i>L. citrovorum</i>	0,4-0,8 - " -	
<i>Lb. lactis</i>	0,05-0,3 - " -	(fullstendig effekt)
<i>P. shermanii</i>	0,1 - " -	

von Timroth 1953. Inverkan av penicillin på *Streptococcus diacetylactis*. Svenska Mejeritidningen 45(6).

Storgårds, 1962. Detection of Penicillin and other Antibiotics in milk. International Dairy Federation. Ann. Bull. III.

Aureomycin i konsentrasjoner fra 0,0005 til 0,001 mg/l melk vil fullstendig stoppe produksjon av melkesyre og så små mengder som 0,00005 til 0,0001 mg/l vil virke hemmende.

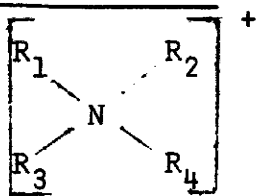
Antibiotika i meierimelk har etterhvert blitt et alvorlig problem for meieriene. Melken fra ett eneste behandlet dyr i en buskap kan være tilstrekkelig til å ødelegge syra dersom melken fra denne buskaper nyttes til syremelk, og den kan skape store vansker ved fremstilling av meieriprodukter hvor en god melkegjæring er essensiell.

Et faremoment av et annet slag representerer de forskjellige moderne desinfeksjonsmidler som p.g.a. ukyndig bruk ute på gårdene kan komme over i melken. Det er særlig de kvartære ammoniumforbindelsene som en her tenker på. Disse har fått en viss utbredelse i de seinere år, og har også blitt nyttet som desinfeksjonsmidler til melkeredskap.

De kvartære ammoniumforbindelsene er hypervirksomme mot mikroorganismene i syrekulturen.

En har en rekke forskjellige typer av kvartære ammoniumforbindelser og ved innføring av forskjellige grupper i molekylet kan en få varierende desinfeksjonseffekt.

Fig. 3.4.1.2.3.



Cl⁺ eller Br⁺

Ved en tilsetning på bare 3 mg/l av typen alkyl-dimetylbenzyl-amoniumklorid i melk fås en tydelig hemning av syrningen. Vanligvis vil en mengde på 50 til 100 mg kvartære ammoniumforbindelser pr. liter melk være tilstrekkelig til fullstendig å stoppe syrningen. Toleransen for kvartære ammoniumforbindelser ligger mellom 1 og 10 mg/l, for ystemelk sannsynligvis på 1 mg/l. Dette viser at disse stoffene kan være meget farlig for melkens syrningsegenskaper og bør derfor ikke nyttes som desinfeksjonsmidler for melkeredskaper på gårdene.

Klorforbindelsene, som hittil har vært de mest alminnelig anvendte desinfeksjonsmidler for melkeredskaper, er mindre farlig i så måte da de blir inaktivert av organisk materiale og da særlig av melkeproteinet. En tilsetning av 5 % melk i en aktiv klor-desinfeksjons-løsning vil nedsette desinfeksjonseffekten med 10 %. De kvartære ammoniumforbindelsene er derimot relativt stabile i melken og vil hemme melkesyreproduksjonen når de er tilstede i tilstrekkelig mengde.

3.4.2.1.3. Faktorer av betydning for valg av syremelk. - *valgt ut nøye av det som står her.*

Vi vet at en god aromatisk syre er betinget av at syrekulturens bakterier passer sammen og at en har det ønskede balanseforhold mellom kulturens melkesyrestreptokokker og Leuconostoc, d.v.s. at en har et gunstig forhold mellom disse to bakterietypers celler tall. Syredannelsen må derfor ikke foregå hurtigere enn at Leuconostoc får en rimelig tid til vekst og utvikling. En tørrstoffrik melk vil derfor være gunstigere som syremelk enn en tørrstofffattig, da den tørrstoffrike melk inneholder mere bufferstoffer. Jo mere bufferstoffer melken inneholder, desto mere melkesyre kan dannes før kulturens pH blir så lav at veksten av Leuconostoc opphører. Som syremelk foretrekkes tørrstoffrik melk fremfor tørrstoff-fattig, også av den grunn at den tørrstoffrike melk gir et fastere koagel som har større evne til å binde myse.

Den melk som skal nyttes til fremstilling av syrekulturer må være av meieriets beste. Syren lages vanligvis av helmelk. **Hel-**melk gir en syre med fyldigere smak, bedre konsistens og mindre myseutskillelse enn skummet melk. (Da dessuten separatoren kan være en mulig infeksjonskilde kan det være en fordel å unngå skumming.) Enkelte meierier nytter samlemelk til syrelaging, men de fleste foretrekker å velge ut syremelk blant sine beste leverandører, enten fra en bestemt leverandør eller bedre fra flere leverandører med større besetninger. I siste tilfelle skulle faren for abnorm melk fra enkelt-dyr bli redusert. Valgmulighetene ved tankmelk-leveranse er imidlertid minimal.

uten inf-ke ved bruk av separat.

Fin bulas mest skumma, eller ystemjolk som syremjolk

På meieriene må en nytte lukt-og smaksprøven, reduktaseprøven og gjær-reduktaseprøven til å plukke ut den mest hensiktsmessige melk til syrelaging, og en må bare nytte den melken som viser et godt resultat ved disse prøvene.

gjørens. Mikrobiologisk 1938. Ikke bakt i Norge.
Gjær-reduktaseprøven skal vise et jevnt homogent sammenløpt koagel. Denne prøven har dessuten sin betydning som hjelpemiddel til å plukke ut melk som inneholder antibiotika og hemningsstoffer for melkesyrebakteriene.

I tilslutning til de her nevnte prøver kan det også være ønskelig med andre prøver som kan gi opplysninger om melkens innhold av sporedannere, tørrstoffinnhold og om den har et normalt innhold av citronsyre. Selv om sporedannere som overlever pasteuriseringen ikke kommer til utvikling i syra, vil en eventuell tilstedeværelse av dem kunne gi et bilde på fjøshygiene. De bør derfor ikke forekomme i syremelk.

NB!
Kravene til syremelken kan en sammenfatte som følger:

1. Melken skal ha god, ren smak og lukt.
2. Melken må vise l.kl. i reduktaseprøven og ha et jevnt homogent koagel i gjærreduktaseprøven. Dette viser at den er et egnet substrat og ikke har gassproduserende og peptoniserende bakterier
3. Melken må være fri for mikroorganismer som danner antibiotiske substanser som hemmer melkesyrebakteriene.
4. Melken bør være fri for antibiotika som penicillin, aureomycin og lignende stoffer som nyttes i kampen mot jurbetennelse.
5. Melken bør være fri for sporedannere.
6. Melken bør være tørrstoffrik.
7. Melken må ha et normalt innhold av citronsyre og mangan.

Flere og flere meierier bruker rekonstituert skummetmelk ^{pulver} til syremelk både til modersyre og brukssyre. Det stilles da strenge krav til skummetmelks-pulveret kvalitet såvel som til det vannet pulveret løses opp i. (I denne forbindelse kan nevnes at substratfabrikken Oxoid leverer skummetmelkpulver som garanteres ikke å inneholde varmeresistente mikroorganismer, men dette pulveret er for dyrt for praktisk bruk i meieriene).

Selv om metoden er arbeidskrevende har den følgende uomtvistelige fordel:

Syrningsforstyrrelser som skyldes daglige variasjoner i syremelken blir eliminert.

Eventuelle uregelmessigheter i kulturens syrningsaktiviteter må derfor skyldes selve syrningsorganismene. Kontrollen av kulturen blir lettere.

Ved bruk av rekonstituert melk som syremelk må en ved ny pulverforsyning kjøre parallellprøver en uke sammen med det gamle for å se om det er noen forskjell i pulverkvalitetet.

En må bare nytte rekonstituert melk som syremelk dersom en er helt sikker på at en har et førsteklasses vann.

4. PRODUKSJONSUTSTYR OG FREMSTILLING. - sterkt prega av å pøse Svove for Bår sida

Fremstilling og vedlikehold av syrekulturer er en av de fundamentale produksjoner i meieriet og for å oppnå et godt resultat er det helt nødvendig å vise den største renslighet og nøyaktighet i arbeidet. Syrelagingen bør derfor ikke utføres i all hast mellom annet forefallende arbeid.

Blir mindre og mindre akseptert ettersom ein har fått ledi set.

Den beste måten å holde en syre vedlike på gjennom et lengre tidsrom er ved såkalt delt syrelaging, d.v.s. at en har to adskilte kulturer, en såkalt modersyre og en brukssyre. Modersyren holdes i små enheter, ikke stort større enn det som skal til for å pøde brukssyren. (På store anlegg der behovet for brukssyre er stort kan det dessuten være aktuelt å operere med en såkalt mellomtsyre for å unngå for store modersyre-volum).

Fordelen ved dette systemet er at ved å holde modersyren i små enheter, er det langt lettere å unngå infeksjoner, både fordi små porsjoner er lettere å håndtere og ved at sjansene for infeksjon, særlig da faginfeksjon reduseres når modersyren holdes adskilt fra brukssyren, helst i rom som ligger lengst mulig vekk fra produksjonsrommene.

En annen fordel ved delt syrelaging er at en kan holde flere modersyrer gående parallelt. Ved å holde flere syrer samtidig er det lettere å bedømme kvaliteten på kulturen og en kan velge den beste til poding av brukssyren.

Det kan også være aktuelt å nytte litt andre fremstillingsbetingelser for brukssyre enn for modersyren. Hensikten med modersyren er å ha et mest mulig stabilt podemateriale over et langt tidsrom.

Brukssyren derimot er en engangsproduksjon. Her kan det f.eks. være mest om å gjøre å ha et podemateriale med størst mulig syrningsaktivitet i bruksøyeblikket.

Størrelse og kvalitet på modersyrebeholderne vil være det første problem det må tas standpunkt til i forbindelse med syrelagingen. Modersyrebeholderen bør ikke være større enn det som er nødvendig for poding av brukssyre og for gjennomføring av kvalitetskontroll på kulturen. Dersom behovet for brukssyre er stort vil det som nevnt være aktuelt å nytte en såkalt mellomtsyre.

Andre spesialarrangementer kan også komme på tale. Avhengig av om det brukes mellomtsyre eller ikke, vil det være aktuelt å holde modersyren i porsjoner fra ca. 1/2 l og opp til 3-4 l. De fire-liters rustfrie syresåer er velkjent blant alle meierifolk og trenger ingen nærmere beskrivelse.

Alternativet til disse syresåene er glassflasker med skrupropp (helst av varmebestandig glass), og det fås nå også flasker i plast med et spesielt system for podning.



Fig. 4.1. Astell modersyrebeholdere og utstyr for podning.

Disse er varmebestandige og kan dykkes helt ned i varmemediet under pasteuriseringen. De tåler imidlertid ikke autoklaving.

Glass er et indifferent materiale som ikke tilfører kulturen noen uønskete stoffer og har den fordel at en kan iakta innholdet. For kontroll av kulturen er det en fordel å kunne se om koaglet er

homogent sammenløpt eller om det foreligger gassblærer eller myse-utskillelse.

Lukning av beholderen med skrupropp er også en fordel med tanke på infeksjons-risikoen, men trang hals har den ulempe at det er vanskelig å få rørt ut koaglet.

Ved opprøring av koaglet får en et godt inntrykk av koaglets kvalitet og det er lettere å foreta utpodningen. Dette gjøres lettest i de vanlige syresåene. Glass som materialet er også noe skjørt til bruk ute i meieriene.

Modersyrebeholdere bør være forsynt med et merke slik at de lett kan fylles med et kjent volum melk. Forøvrig må alle mål, øser, beholdere og rørere lett kunne steriliseres i et dampskap og alltid finnes i et tilstrekkelig antall. Skummeskjeen kan med fordel sløyfes i utstyret da skumming av syra har liten verdi sammenliknet med den økning i infeksjonsrisiko en får. Alt bør legges tilrette for å gjøre infeksjonsfaren minst mulig.

For å unngå at syremelken skal bli infisert av den luften som alltid suges inn i beholderen når syremelken avkjøles etter varmebehandling, må dette utstyret plasseres i særskilte rom, som står under overtrykk med filtrert og sterilisert luft. (Ultrafiolett lys eventuelt sterilfiltrert).

Bomullspropper kan brukes for å unngå slik infeksjon dersom en nytter mindre glassbeholdere til modersyren, men i praksis er slike propper neppe å anbefale da de lett blir gjennomfuktet eventuelt med melk og virkningen blir illusorisk. Den beste lukning på glassbeholdere er varmebestandige skrukapsler med god pakning. Pakningen kan eventuelt være laget av neopren med henblikk på prøveuttak og podning med kanyle. Skrukapslene får da gjerne utforming som en ring lik lukningen på "Norgesglass".

Uansett beholdertype bør disse ikke fylles mer enn 3/4-fulle for å hindre overkok. Plastbeholderne kan ^{imidlertid} fylles praktisk talt fulle da de blir hermetisk lukket og selve beholderen er fleksibel. Spesialbeholdere i plast leveres i størrelsene 100, 500 og 1000 ml.

Figur 4.1.

Dersom en velger å bruke beholdere av glass leveres det nå bl.a. erlenmeyerkolber med skrupropplukning i de mest kurante størrelser. Disse egner seg også godt som syrebeholdere.

Hovedelementene i fremstillingsteknikken er karakterisert ved:

1. Syremelkens pasteurisering. (Substrat-behandling).
2. Podning.
3. Inkubasjon.
4. Kjøling og oppbevaring.

Først skal vi se litt på det utstyr som nyttes i forbindelse med disse prosessene.

4.1. Modersyre.

4.1.1. Tilberedning og varmebehandling av syremelken. Utstyr og praksis.

Den viktigste substratbehandlingen er her pasteuriseringen. Ved bruk av tørrmelk vil dessuten rekonstitueringen av melken være et viktig arbeid.

Dersom rekonstituert melk bare skal nyttes til modersyre kan man med fordel nytte en såkalt "jernku" for å få en god bearbeidning av løsningen, men for rekonstituering av større mengder (brukssyremelk) nyttes gjerne et resirkulerings-anlegg som vist på figur 4.1.1.

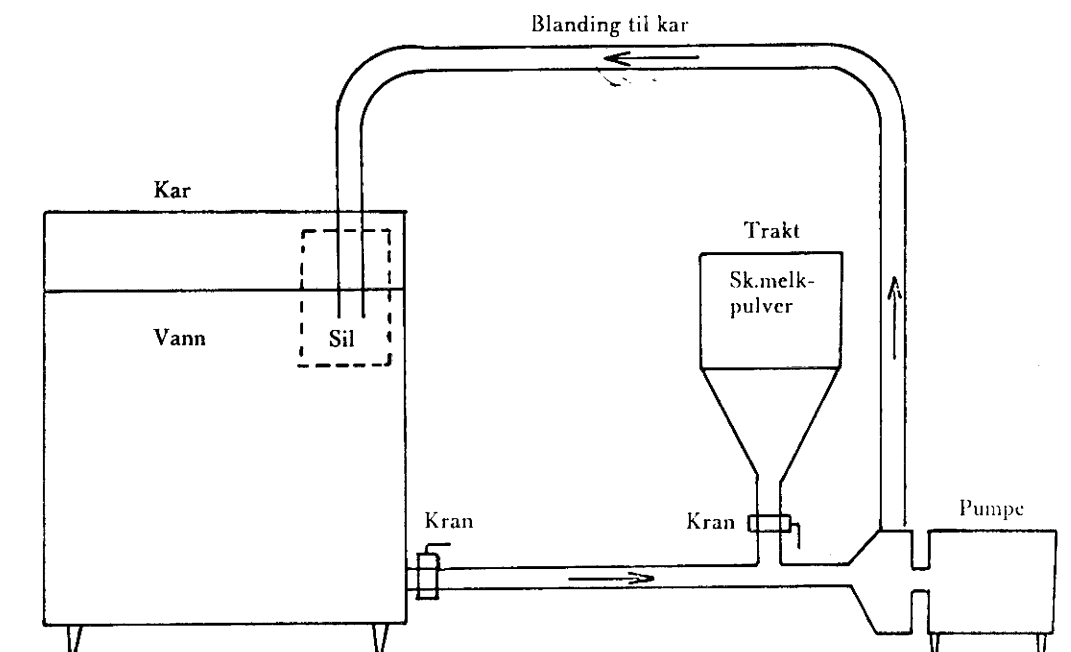


Fig. 4.1.1. Innretning til rekonstituering av tørrmelk. (Etter Oterholm & Aae 1973. X. Nord.Meit. tekn. Kong.)

Det skulle være unødvendig å påpeke viktigheten av å gjøre dette arbeidet omhyggelig.

Vanligvis nyttes ingen tilsetninger til syremelken, men mangan i form av mangansulfat kan brukes for å stimulere Leuconostoc. Varmebehandlingen av syremelken er essensiell.

Syremelkens varmebehandling kan enten utføres ved autoklaving eller ved pasteurisering i strømmende vanddamp. Det siste er langt det vanligste for kombinerte syrevekkere d.v.s. aromatiske kulturer.

Sterilisering i autoklav fører til at melken får brun farge, kokt smak og gir et bløtt koagel. Kokt smak vil vanskeliggjøre bedømmelsen av kulturens smak og aroma og filtrering blir også vanskelig p.g.a. egenfargen. Autoklaving blir derfor ikke mye nyttet ved fremstilling av modersyre i smør-produksjonen, men sterilisering i autoklav fører til ødeleggelse av alle mikroorganismer og blir derfor ofte brukt ved fremstilling av spesialsyre som skal nyttes i osteproduksjonen. Melken må ikke autoklaveres sterkere enn at den bare såvidt får en antydning til brunfarge.

4.1.1.1. Autoklaving.

Den enkleste autoklaven en har i praksis er den vanlige trykk-koker som kan settes direkte på en elektrisk kokeplate eller gassbluss. Plassen i slike beholdere er sterkt begrenset selv om det også finnes relativt store trykk-kokere i handelen, egentlig beregnet på store anstalthusholdninger. (Rustfrie trykk-kokere på 8 l har vært endel brukt for tilberedning av substrat for propionsyre-kulturer ute på meieriene. En har da nyttet selve trykk-kokeren direkte som syrebeholder).

På meierier der en har adgang til trykk-damp vil en enklest og best kunne koble autoklaven til dampnettets via en god reduksjons-ventil.

På meierier med brunostgryte (LT-Gryta) kan denne også anvendes som autoklav. (Alt utstyr for varmebehandling av modersyremelk bør imidlertid helst være plassert i separat syrningsrom).

Ved sterilisering i autoklav har en vanligvis ingen mulighet til å kontrollere temperaturforløpet direkte i mediet under autoklaving. En må her huske på at jo større enkeltporsjoner som settes inn desto lengre tid tar det å få bragt temperaturen i porsjonen opp til den ønskete verdi, og det samme gjelder for nedkjølingen.

Autoklavens fyllingsgrad virker også inn på hvor raskt trykket og dermed temperaturen i denne går opp til ønsket nivå. Når temperaturen i autoklaven har kommet opp til det den er innstilt på, må en alt etter porsjonenes størrelse kalkulere med et erfaringsmessig tillegg i steriliseringstid.

Temperaturkurven i varierende porsjoner av forskjellige media (viskositeten virker inn) kan tas opp ved hjelp av termoelementer.

4.1.1.2. Kokende vannbad.

Den enkleste måten å pasteurisere modersyremelken på er med strømmende vanddamp eller kokende vannbad. Bare eventuelle sporedannere vil kunne overleve denne varmebehandlingen, men ^{dose} ~~de~~ får ingen utviklingsbetingelser i det sure miljøet i melkesyrekulturen.

Til modersyremelk skal en ha en egen dampsterilisator med plass for eventuell mellomtsyre. Denne skal ikke stå i meierilokalene, ^{NB} men plasseres i separate syrningsrom.

Dampsterilisatoren bør utstyres med indirekte oppvarming av vannet, d.v.s. lede dampen inn gjennom en rørsløyfe i bunnen på beholderen med kondenspotte på utløpet, dette for å unngå det bråket en får hvis dampen ledes direkte inn i varmemediet i kokeren.

Vann-nivået i kokeren må kunne reguleres ved et regulerbart overflomsrør og dette overflomsrøret må ha stor nok dimensjon til å

ta unna det kjølevannet en nytter etter pasteuriseringen. Ventilen for kaldtvannstilførsel og avløpsrør bør avpasses i forhold til hverandre.

Syrekokeren bør ha en bunnventil slik at varmemediet raskt kan skiftes ut, først og fremst for renholdet, men også for å kunne foreta en raskere nedkjøling etter pasteuriseringen. Melken bør kjøles så hurtig som mulig til podningstemperatur, hvis den skal podes straks. I tilfelle podningen ikke kan foretas med det samme bør melken kjøles så langt ned mot $^{\circ}\text{C}$ som mulig, og så varmes opp til podningstemperatur umiddelbart før podningen.

Lokket på syrekokeren bør bue oppover og ha en fals som går ned på innersiden av veggene, dette for å unngå at kondens renner ned på utsiden. Noen kokere har også innlagt kaldt vann i falsen mot lokket og en unngår da at det damper av kokeren når lokket er på.

Kontroll av pasteuriseringstemperatur, podnings-og inkubasjonstemperatur utføres best ved å pasteurisere, kjøle og inkubere en beholder med vann sammen med moderkulturene. Denne bør være av samme type som kulturbeholderen og forsynes med termometer og fylles med samme væskemengde som kulturbeholderne.

4.1.2. Effekter av syremelkens varmebehandling.

Varmebehandlingen, d.v.s. pasteuriseringen av syremelken gjøres først og fremst for a) å ødelegge størstedelen av de mikroorganismene som melken inneholder i rå tilstand, men samtidig b) virker varmebehandlingen inn på melkens strategenskaper slik at den blir et bedre medium for syrningsorganismene.

c) For det tredje virker varmebehandlingen inn på konsistensen til syrekulturen.

Melkens varmebehandling gir utpreget effekt på dens strategenskaper. Etter den aktuelle temperatur og tid av varmebehandling opptrer det etter hverandre stimulerings-og hemningseffekter. Effektene er ikke de samme for forskjellige mikroorganismer,

så årsaksforholdet er ofte vanskelig å danne seg bilde av. En forbedring i melkens substrat-egenskaper kan f.eks. komme av

- a) dannelse av vekststimulerende stoffer
- b) ødeleggelse av hemningsstoffer
- c) begge deler.

Det siste er vel det som aktuelt skjer. Det omvendte forhold kan da være skyld i at enkelte intervaller i varmebehandlingen virker mindre gunstige på substrategenskapene.

Vi vet at varmebehandlingen av melken forbedrer dens substrat-egenskaper p.g.a. en reduksjon av termolabile hemningsstoffer. Varmebehandlingen driver videre ut oksygen og danner cystein med senking av melkens redokspotensial til et nivå som er gunstig for melkesyrebakterienes vekst samtidig som det skjer en denaturering av serumproteinene (mer vannbindende koagel).

De forskjellige intervaller i substrategenskaper som melken gjennomgår ved varmebehandlingen kan simuleres ved tilsetninger av varmebehandlet myse (denat.serumproteiner), protein-spaltingsprodukter som cystein eller andre stoffer med SH-grupper.

Frigjøring av SH-grupper virker positivt, mens dannelsen av sulfider har toksisk virkning og reduserer den positive virkning av varmebehandlingen i noen grad.

Syrningsevnen hos *Lb.lactis* er vist i figur 4.1.2.1. i blandinger av henholdsvis rå og pasteurisert melk og pasteurisert og auto-klavert melk.

For å oppnå en fullstendig ødeleggelse av melkens naturlige bakterieicide effekt må en pasteurisere til minst 75°C i 30 min. ifølge Orla-Jensen. Denne varmebehandling er imidlertid ikke tilstrekkelig til å drepe de uønskede mikroorganismer i syremelken. Orla-Jensen fant at melken minst måtte varmes til 80°C i 30 min. for å ødelegge de uønskede termotolerante melkesyrebakterier.

Melkens varmebehandling har en tydelig virkning på syrekoaglets

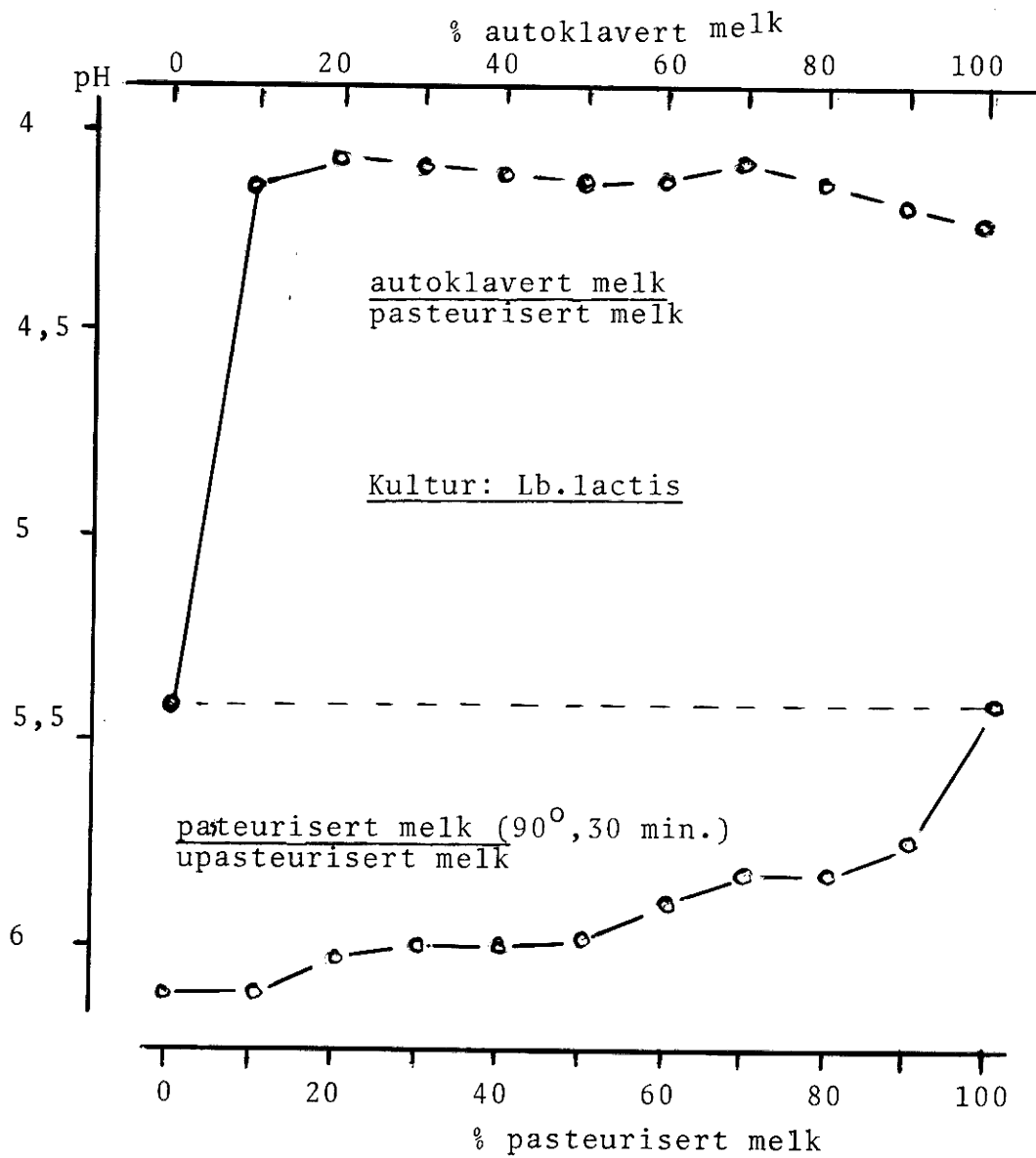


Fig. 4.1.2.1. Melkens varmebehandling og syrningsaktiviteten (etter Auclair 61).

fasthet og konsistens, og på koaglets tendens til å skille ut myse. Lav pasteuriserings-temperatur betinger et løst koagel som lett utskiller myse. Koaglets fasthet og mysebindingsevne øker innen visse grenser med pasteuriseringstemperaturen. Kosikowsky og Brueckner (1941) fant at en oppnådde det beste koaglet med minst tendens til myseutskillelse når en pasteuriserte melken ved 86°C i 30 min. *> best koagel* Pasteurisering til 93-95°C i 30 min. førte til litt større tendens til myseutskillelse, men koaglets fasthet var omtrent som ved pasteurisering til 86°C i 30 min.

Storgårds 1964 har undersøkt varmebehandlingens betydning for viskositeten på den ferdige kultur og hvordan denne har sammenheng med felling av serumproteinene, figur 4.1.2.2.

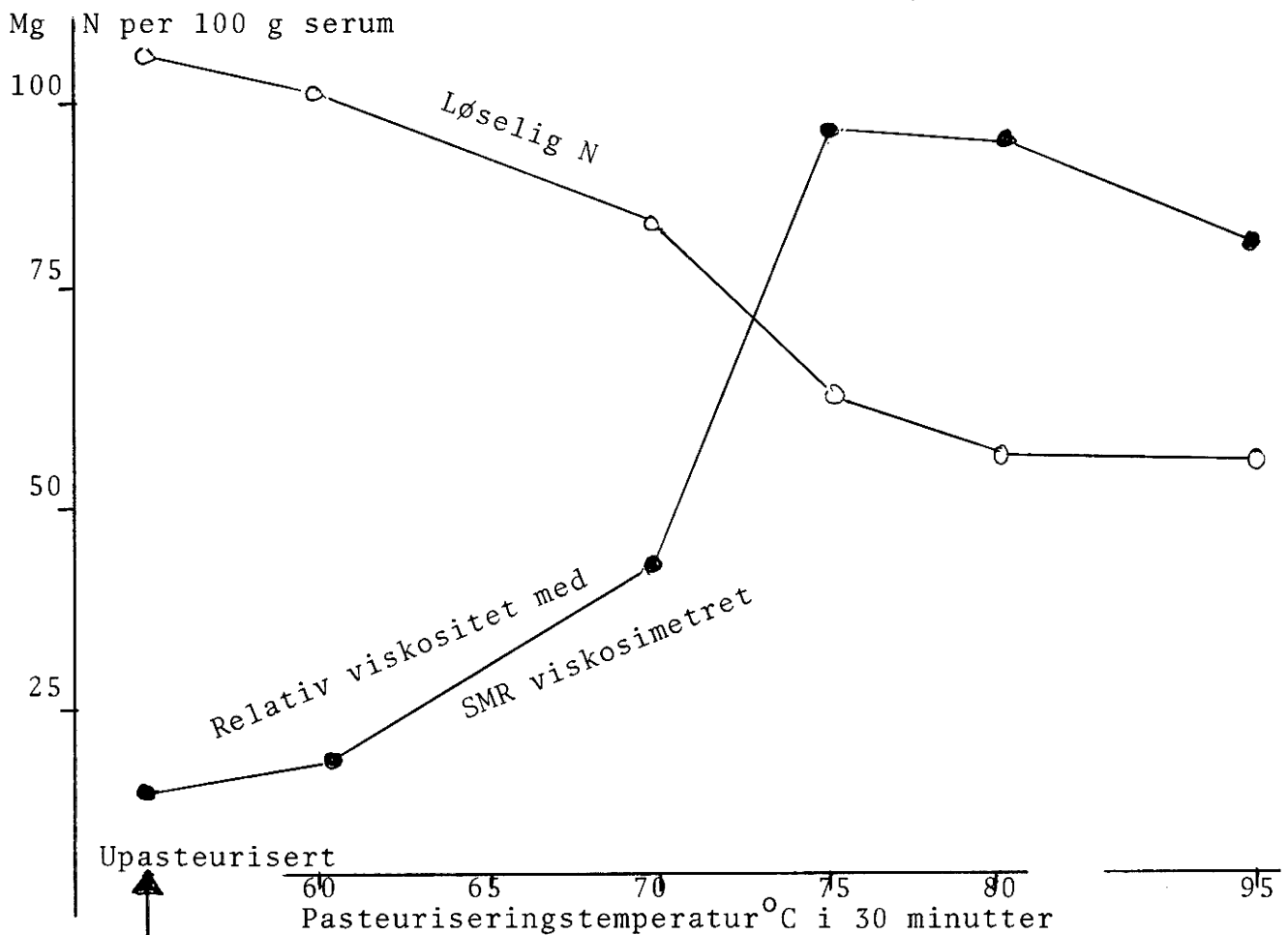


Fig. 4.1.2.2. Etter Storgårds, 1964. Heat treatment of milk prior to the addition of cultures. I.D.F. Ann.Bull.III,s.65.

Kosikowsky & Brueckner, 1941. A study of factors influencing the quality of cultured skim milk or buttermilk. Milk Dealer 30(11):36.

Storgårds fant at for yoghurt og kulturmilk var den beste konsistens-messige varmebehandling 85°C i 15 min, eller 80°C i 30 min. Samme resultat ble oppnådd i plateapparat ved $90-95^{\circ}\text{C}$ med 2 min. holderceller.

Konsistensen av modersyrekulturen spiller mindre rolle som kvalitets-egenskap sammenliknet med de sure konsum-produkter. Varmebehandlingen må garantere en tilfredsstillende mikrobiologisk kvalitet på syremelken og pasteurisering av melken i 30 min. ved 90°C er det vanlige.

Pasteurisering av melken i strømmende vanndamp eller i kokende vannbad fra 30 min. til 1 time eller sterilisering i autoklav i 20 min. vil betinge et relativt bløtt koagel med tendens til myse-utskillelse.

4.1.3. Podning og inkubasjon. Utstyr og praksis.

Når modersyrebeholderne er små, f.eks. flasker med skrupropp, skjer ompodningen eller forplantningen best med pipetter av passende størrelse. Ordinære pipetter er vanligvis for trange i spissen til en så viskøs væske. Man kan derfor med fordel lage seg pipetter av pyrex-rør av passende tykkelse (4-5 mm \emptyset innvendig). Disse steriliseres på vanlig måte i tørrluftsterilisator enten innpakket i silkepair eller helst oppbevart i glass eller metallsylinder.

Faren for infeksjon er redusert til et minimum ved bruk av pipetter, podematerialet kan tas ut fra midten av kulturen og podemengden er lett å kontrollere.

Det er viktig at arbeidet med forplantningen skjer raskt og sikkert. Jo kortere tid kulturen og substratet avdekkes desto mindre sjanse er det for luftinfeksjon. Ved ompodning av litt større mengde modersyre (de vanlige 3-4 l syresåer) er det vanlige at podningen skjer ved å overføre rørreren til den nye melka etter at gelet er rørt opp.

Enklere og raskere kan neppe podingen skje selv om podemengden kanskje kan variere noe ved denne framgangsmåte.

En helt infeksjons-sikker forplanting av modersyra kan en få ved å nytte det spesielle podeutstyr som leveres i forbindelse med modersyrebeholdere i plast. (Se figur 4). Her nyttes en steril dobbel-kanyle forbundet ved en liten hane. Den ene kanylen stikkes inn gjennom gummi-menbranet til flasken med moderkultur, den andre på tilsvarende måte i flasken med syremelka. Hanen åpnes og podematerialet føres over ved å klemme på modersyreflasken. Podemengden her kontrolleres på grunnlag av dråpetelling.

Etter podning bør melken røres forsiktig om for å fordele syrningsorganismene jevnt gjennom hele melkevolumet. Unnlater en å røre om får en et klumpet og ujevnt sammenløpt koagel.

Ved podingen må en ta alle forholdsregler for å unngå infeksjon.

Inkubasjonsutstyret for modersyre skal være plassert i et separat syrningsrom. Ofte er selve syrekokeren for modersyre utført som en kombinert sterilisator og inkubator. Modersyra blir i såfall inkubert i vannbad der det er montert et termostatstyrt elektrisk varmeelement.

Vannbadet har større treghet enn en tørr-termostat og varmeovergangen er større fra væske til gods enn fra luft til gods. Inkubatoren kan da også med fordel nyttes til nedkjøling av den ferdig-syrnede kultur.

Tørrinkubatorer er imidlertid helt tilfredsstillende dersom en påser at det godset som settes inn har riktig temperatur ved innsettelsen. Innstilling av syrningsstemperaturen må alltid gjøres i vannbad, enten inkuberingen skjer i luft eller på annen måte.

Det må settes de strengeste krav til inkubatorens termoregulering særlig da for modersyrens vedkommende. Ofte ser en at samme inkubator nyttes både til modersyre og brukssyre og kravene til termostaten blir de samme. Modersyre og brukssyre bør imidlertid holdes adskilt. En god inkubator skal ha jevn temperatur-fordeling innvendig. I større inkubatorer (for brukssyre) kan det derfor komme på tale å montere inn ^{en} liten vifte. Temperaturen kan enten

Temp. styre-

styres av et godt kontakt-termometer med relé til skapets varme-elementer eller det kan brukes termiske brytere direkte koplet på varmelementet. Nøyaktigheten vil sannsynligvis være størst for førstnevnte prinsipp, men det er her en hel del utmerket utstyr å velge mellom.

De fleste inkubatorer er imidlertid bare utstyrt med varmeelement for kompensering av varmetap. Dette innebærer at termostaten må plasseres i et rom som har lavere temperatur enn det inkubasjonstemperaturen er innstilt på. Om sommeren kan dette skape visse problemer enkelte steder. Disse vanskelighetene kan avhjelpes med å bygge inn en liten kobberspiral som en kan sirkulere kaldt vann gjennom i den varmeste tiden om sommeren. Det må da påses at en ikke tilfører mer kulde enn hva termostats element greier å kompensere.

Inkubasjonstemperaturen må kontrolleres nøye. Dette gjøres best ved å plassere et termometer i en flaske med klorvann eller sprit i termostaten. For å unngå fordampning bores et hull i proppen som nøyaktig tilpasses termometeret. Termometerkulen plasseres nede i vannet og temperaturen avleses uten å fjerne flasken fra termostaten.

. En bør gjøre det til regel å avlese temperaturen når en setter kulturen inn i termostaten og når den tas ut for kjøling. Det lar seg ikke gjøre å bestemme middeltemperaturen i inkubatoren ved bare å plassere et termometer på hyllen i termostaten. Termometeret vil vise for høg temperatur hvis varmeelementet har vært på like før avlesningen finner sted. Det vil bare vise rett (innstilt) temperatur om avlesningen skjer like før varmeelementet kobles inn. Fluktusjoner her vil avhenge av hvor godt varmeelementets kapasitet er tilpasset inkubatorens varmetap til omgivelsene.

Skrivere for automatisk registrering av temperaturforløpet kan med fordel nyttes til kontroll av inkubatortemperaturen, men dette er kostbart utstyr.

De mest avanserte inkubatorer er også utstyrt med programmert styring av temperaturen, slik at man under syrningsperioden kan få en gradevis senking av temperaturen og automatisk nedkjøling av moden kultur. (Viskubator, Diinkubator).

For å få et homogent og jevnt sammenløpt koagel med god mysebindingsevne er det viktig at melken får stå i ro under syrnings-tiden. Spesielt viktig er det at melken er i ro i koagulasjonsøyeblikket. Bare små forstyrrelser kan da forårsake et ujevnt sammenløpt koagel og syremelken blir klumpet og har lett for å skille ut myse.

4.1.4. Effekter av poding og inkubasjon.

I det øyeblikket kulturen skal podes vil melkens syrningsanlegg og kulturens aktivitet være gitt.

Avgjørende for kulturens kvalitetsegenskaper blir nå de tre faktorene:

- a) podemengde
- b) inkubasjonstemperatur
- c) inkubasjonstid.

Dette er så å si frie variable som kan varieres innen visse grenser, men en må være klar over at det her gjelder å komme frem til optimale syrningsbetingelser og mest mulig standardisere disse m.h.t. forplanting og syrning. Inkubasjonstemperaturen har lite slingringsmonn for den enkelte kultur.

Små endringer i temperaturen kan forårsake relativt stor effekt i en blandingskultur. For de fleste kulturer synes den optimale syrningstemperatur å ligge i området 21-22°C. I dette temperaturområdet får man det beste balanseforholdet mellom *Leuconostoc* og *S. lactis/cremoris/diacetilactis*. Men det er vist at en noe lavere temperatur bør nyttes for enkelte kulturer. (Flora Danica spesialkultur for ysting, 18 timer 18°C). Blir temperaturen for lav vil vekstforholdene for melkesyrebakteriene bli dårligere og *Leuconostoc* vil særlig bli hemmet i sin utvikling. Følgen er en kultur med langsom vekst og syrning, og den blir lite livskraftig. Dessuten får en et løst koagel som lett utskiller myse. Koaguleringen skjer først ved relativt høg surhetsgrad på grunn av den lave temperaturen.

Eventuelle psykrofile organismer som måtte forekomme i syremelka vil også kunne få bedre utviklingsbetingelser.

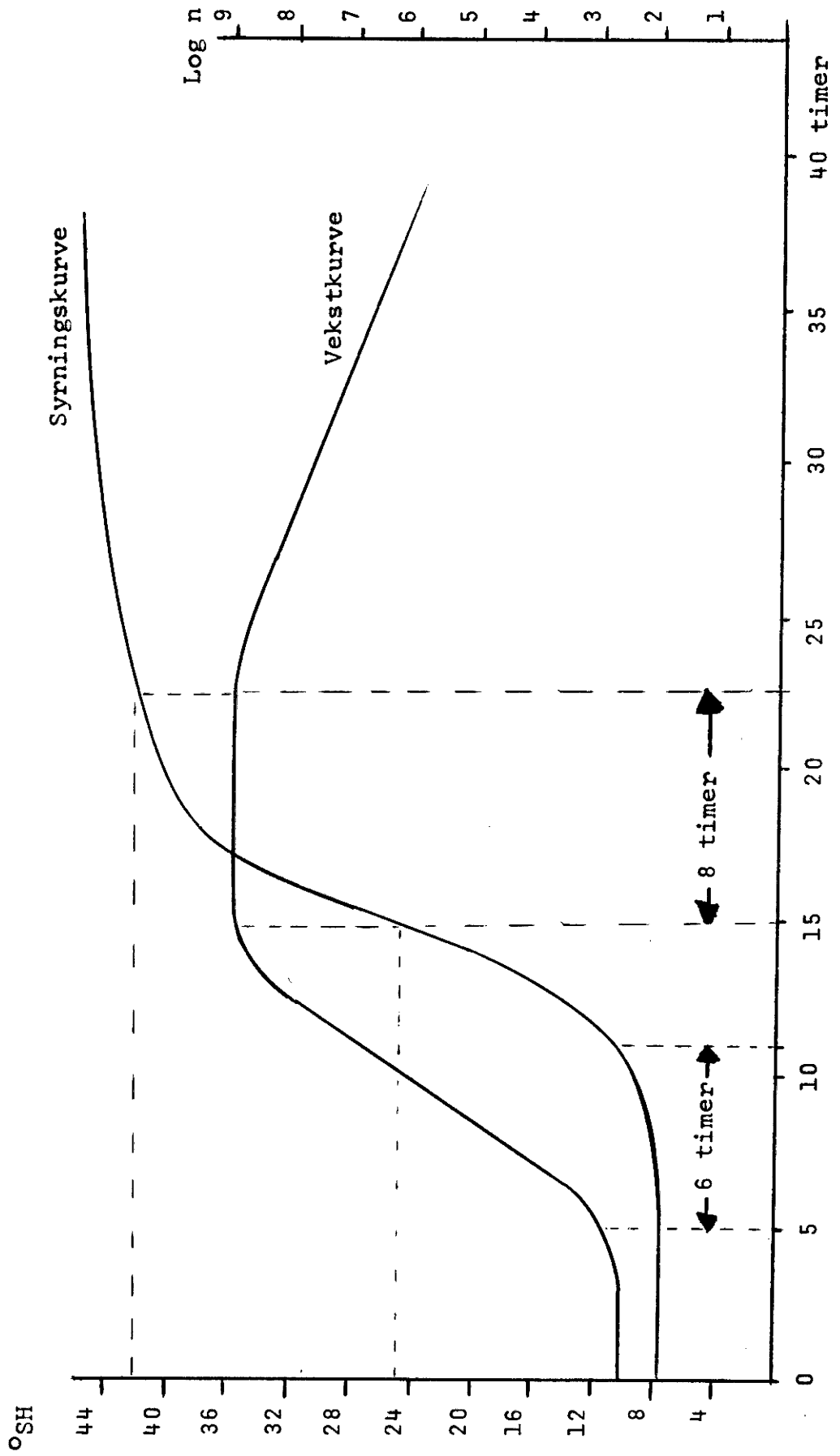
Bruker man høgere inkubasjonstemperatur enn 22°C vil man i L og DL kulturer favorisere veksten i lactis-gruppen på bekostning av Leuconostoc. Selv om optimumstemperaturen for denne kan ligge nærmere 25°C enn 21°C vil den mer robuste S.lactisgruppen få altfor gode betingelser, kulturen blir for fort sur, den koagulerer ved relativt lav surhetsgrad p.g.a. temperaturen og man får et seigere koagel som er vanskeligere å røre ut. Syra blir sur og aromaløs. Eventuelle termofile organismer som måtte forekomme i syremelka vil også få bedre utviklingsbetingelser.

Det er derfor meget viktig at inkubasjonstemperaturen holdes mest mulig konstant i det optimale område for den aktuelle kultur. Enkelte syrevekkerlaboratorier anbefaler imidlertid at syrningen starter opp på en relativt høg temperatur ($21\text{-}25^{\circ}\text{C}$). Etter høgst 4-6 timer senkes så temperaturen til $18\text{-}21^{\circ}\text{C}$ med ytterlig 3-5 graders temperatursenkning i løpet av inkubasjonsperioden. En slik praksis kan neppe anbefales uten at man har helautomatiske inkubatorer og det foreligger heller ikke publiserte forsøksresultater som viser at en slik framgangsmåte er fordelaktig.

Dersom man vil påvirke syrningen i en blandingskultur, i en eller annen retning, bør en helst ikke bruke temperaturen som justeringsfaktor, men heller variere syrningstiden og podemengden.

Disse to faktorer henger nøye sammen, idet svak poding krever lang syrningstid og omvendt. Det er derfor naturlig å behandle poding og inkubasjon under ett.

Disse faktorene må avstemmes slik at vi etter endt inkubasjon har fått en kultur som er høvelig utvokst d.v.s. som er både aktiv, livskraftig og i riktig balanse. For å kunne fastlegge de optimale syrningsforhold for kulturen bør en kjenne til dens vekstkurve d.v.s. på et hvert tidpunkt i kulturens utvikling vite celledallet og helst også forholdet mellom de forskjellige grupper.



Figur 4.1.4.1.

Dette lar seg ikke så enkelt bestemme i praksis, men en vet så noenlunde hvordan syrningskurven korresponderer med vekstkurven i en normal blandingskultur. Å følge kulturen med titreringer gjennom syrningsfasen lar seg også enkelt gjøre.

*

På figur 4.1.4.1. er vist hvordan en syrningskurve korresponderer med en vekstkurve av en vanlig blandingskultur inkubert ved 21°C og 1 % poding. Vekstkurven har fire hovedfaser, nemlig nølefasen, vekstfasen, den stasjonære fasen og dødsfasen.

I praksis er en interessert i å få kulturen raskest mulig i vekst og gjæring, d.v.s. gjøre nølefasen kortest mulig enten det nå dreier seg om modersyre, brukssyre eller i ystekaret.

Kortare nølefase

Det oppnår en dersom en poder med bakterier som befinner seg i den logaritmiske vekstfasen. Disse bakteriene har innstilt seg på vekst og deling og fortsetter med det dersom miljøet de forplantes i er normalt. En kultur som stadig ompodes fra den logaritmiske vekstfasen har imidlertid vist seg å være lite livskraftig.

Cellene i den mest aktive vekstfasen er svært sensible og har lett for å bukke under. Fag-angrep f.eks. foregår lettest i denne fasen ¹⁰⁹ †. Kulturen må få vokse ut slik at cellene kommer over i en kviletilstand. Det er når kulturen har kommet i den stasjonære fasen at en har det beste podemateriale, d.v.s. celler som både er aktive og livskraftige. Inkuberes kulturen så lenge at den kommer over i dødsfasen taper den igjen sterkt i aktivitet. Det er derfor svært viktig at kulturen kjøles ned på det riktige tidspunkt.

Sammenlikner vi syrningskurven med vekstkurven ser vi at syrningen begynner å skyte fart først 5-6 timer etter at veksten har kommet godt igang. Den stasjonære perioden inntreer ca. 15 timer etter poding og varer i ca. 8 timer, til ca. 23 timer etter poding. I dette tidsrommet har syrningskurven steget fra ca. 25 til 43°SH . Kulturen koagulerer først ved ca. 29°SH og dette tør vel være den lavest surhet som bør brukes selv til ysting. I er L-syrevekker har oitratforgjæringen knapt kommet skikkelig igang på dette tidspunktet, mens citronsyren akkurat er oppbrukt og diacetylinnholdet på sitt høyeste i en D/DL-syrevekker.

En må imidlertid huske på at en også til ysting av ~~teksturerte~~ oster vil være interessert i et balansert innhold av citronsyreforgjæring i kulturen. Som den mest kravfulle organisme i kulturen, må en regne med at *Leuconostoc*, prosentvis vil utgjøre et større antall av cellene i kulturen etter hvert som *lactis/cremoris* gruppen legger miljøet til rette for disse. Selv om deling og vekst stopper opp etter hvert på grunn av melkesyrekonsentrasjonen, fortsetter og stimuleres citratforgjæringen. *Leuconostoc*-cellene selv tåler melkesyre bedre enn *lactis-cremoris* gruppen gjør det. For å få et podemateriale som også inneholder et tilstrekkelig antall livskraftige *Leuconostoc*-celler bør man antakelig også for ystingsformål syrne kulturen til en SH opp mot den øvre grense, dersom man har erfaring for at dette ikke går ut over kulturens aktivitet. En vil da også få en kultur med bedre smak og aroma og et koagel med vesentlig bedre mysebindingsevne. Ved å kjøle kulturen ned til 2-3°C i begynnelsen eller litt før den stasjonære vekstfasen inntreffer vil denne del av vekstfasen bli forlenget og kulturens aktivitet som podemateriale vil bli sterkt forbedret. Kjølingens betydning for surhetsgraden og aktiviteten er vist skjematisk i figur 4.1.4.2.

I praksis nyttes det vanligvis syrningstider fra 14 til 20 timer for L og DL-syrevekkere.

Ved ekstra høg podeprosent kan syrningstiden kortes ned til mellom 7-9 timer. Dette kan være gunstig for kulturens aktivitet dersom den skal nyttes til ysting, men det vil gå ut over kulturens innhold av *Leuconostoc*. Med så kort syrningstid vil det selv med ekstremt sterk podning bli vanskelig å oppnå en surhetsgrad på mer enn ca. 30°SH. Ved konstant å syrne til lave surhetsgrader har man erfaring for at kulturen taper i livskraft. En vil derfor ikke anbefale den korte syrningsmetoden i praksis. Da man også gjerne vil ha en syrningstid som er praktisk i relasjon til den normale arbeidsdag vil podemengden være den faktoren som det er naturlig å benytte seg av for å innstille en ønsket surhetsgrad etter en bestemt inkubasjonstid. Podemengden har også relativt liten virkning på kulturens endelige surhetsgrad, slik at man her kan tillate seg å gjøre forholdsvis store endringer i forplantningsprosenten.

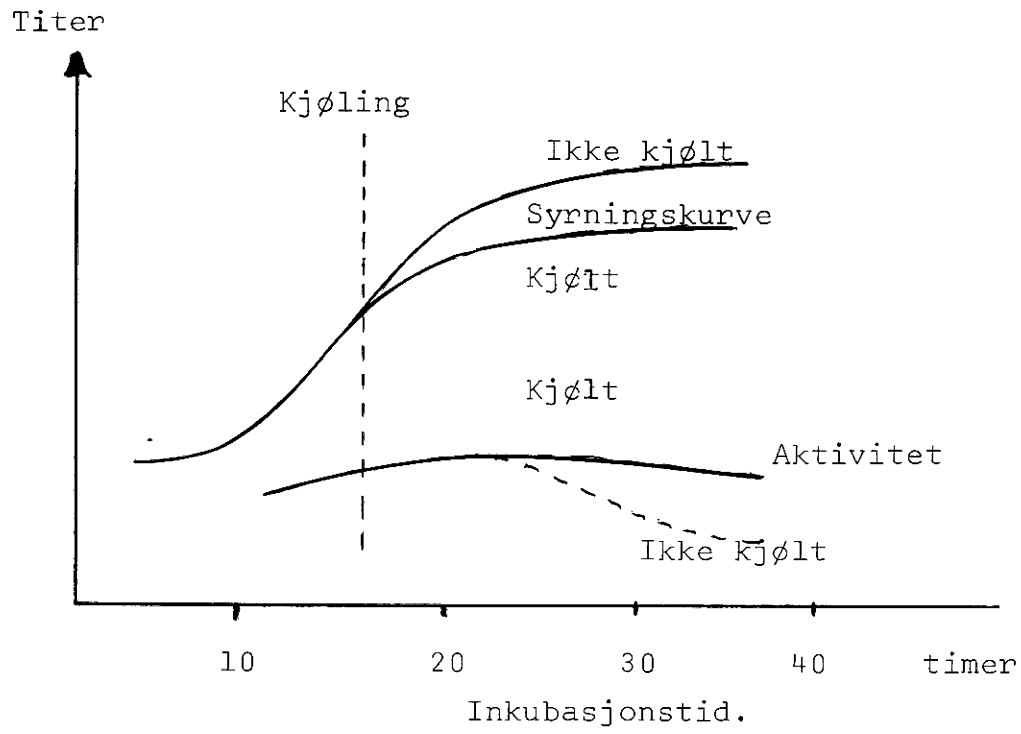
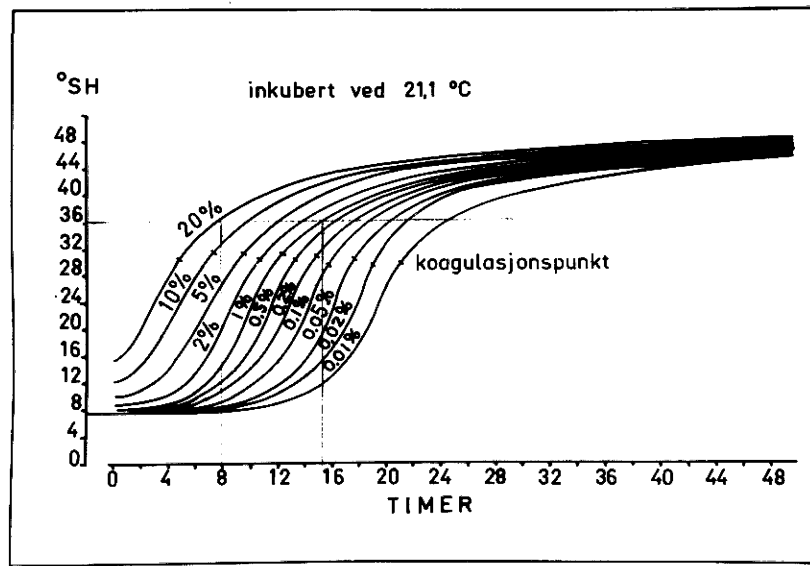


Fig. 4.1.4.2. Kjølingens betydning for aktivitet og surhetsgrad i kulturen.

I praksis kan en regne med ca. 1 times forskjell i syringstid ved dobling, respektivt halvering av podemengden (teoretisk forskjell 30 min.).



Figur 4.1.4.3. Podeprosentens effekt på syredannelsen.

Normalt vil det være aktuelt å variere podemengden mellom 1/2 og 2 %. Dersom kulturen er lite aktiv eller en har syretreg melk vil det være betryggende å nytte en relativt stor podemengde i det en ved å overføre et større antall celler også har et større utvalg av livskraftige celler som kan utvikle seg.

4.1.5. Lagring av kulturer på meieriene.

Helligdager og innskrenket arbeidsuke er forhold som vanskeliggjør en kontinuerlig daglig ompodning av kulturene. Det kan også være tale om kortere eller lengre drifts-stans ved anlegget som gjør spørsmålet om bevaring av kulturen på beste måte uten ompodning, aktuelt.

Lindgren og Swartling (1960) har undersøkt en rekke **alternative** forvaringsmåter for syrekulturer både med hensyn til å lagre kulturene over lengre tidsrom og med hensyn til å belyse spørsmålet: om daglig ompodning av kulturene er nødvendig for å opprettholde syrningsaktiviteten i dem.

For fem forskjellige blandingskulturer ble aktiviteten undersøkt etter 2, 4 og 6 døgn. Det var fem forskjellige lagringsbetingelser. Aktiviteten ble bestemt som syregrad ($^{\circ}\text{Th}$) etter 7 timer med 1 % podning ved 25°C . Resultatet er vist i tabell 4.1.5.1.:

Lagringsmåte	Lagringstid														
	2 døgn					4 døgn					8 døgn				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Som nypodet ved 5°C	42	35	41	52	38	47	34	38	53	40	48	36	44	45	42
" nykoagulert ved 5°C	45	38	48	53	44	25	26	38	49	36	17	16	32	38	35
" moden (24 t.)" 5°C	22	30	36	41	37	16	17	25	20	22	-	-	-	-	
" " " 20°C	20	23	26	26	27	17	17	16	16	16					
" nypodet " $+18^{\circ}\text{C}$	49	32	45	48	39	48	39	46	49	35	50	37	43	42	36

Resultatene for de forskjellige kulturer er nokså entydige. En ser at om en ikke vil fryse kulturene, gir lagring av nypodet kultur ved vanlig kjøleromstemperatur (maks. $+5^{\circ}\text{C}$) i opptil en uke ingen merkbar tap av syrningsaktiviteten. Dersom en nytter denne metoden vil således ikke daglig ^{ompodning} ompodning av kulturene være absolutt nødvendig. En må bare passe på å varme opp den lagrede kulturen til syrnings-temperaturen dagen før den skal brukes og deretter inkubere på vanlig måte. Ved bruk av moderne syrningsutstyr kan dette programmeres inn på forhånd så det skjer automatisk. Metoden er like aktuell for moder-syre som for bruks-syre, eventuelt også for kjernefløte.

Lindgren & Swartling, 1960. Forvaring av syrningskultur.
S.M.R. meddelande nr. 61.

Swartling & Lindgren, 1960. Måste syran skötas varje dag ?
Sv. Mej.tidn. 52 : 631.

Forvaring av kulturer over lengre tidsrom vil bare være aktuell for modersyre. Det kan her f.eks. være tale om å konservere en eller flere kulturer man er spesielt godt fornøyd med, slik at man har en reserve dersom noe galt skulle skje.

Lindgren og Swarling undersøkte her 6 forskjellige lagringsmåter for 6 kulturer og undersøkte aktiviteten etter 2 1/2 og 5 måneders lagring. resultatet er vist i tabell 4.1.5.2.:

		Syrningsaktivitet ($^{\circ}\text{Th}$) etter lagring i:											
		Lagring: 2 1/2 måned						5 måneder					
Lagringsmåte	Kultur:	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
frosset nypodet		62	47	44	54	43	38	44	50	52	57	45	54
" etter 6 t. inkub.		61	48	40	53	42	43	45	63	49	61	45	55
frysetørret		56	52	41	53	39	42	47	64	44	37	44	52
på krittmeik v. 5°C etter 2 t. inkub.		60	30	39	36	40	32						
på stivelsesbuljong v. 5°C etter 24 t. inkub.		56	43	42	50	18	20	50	50	50	37	20	22
utstrøket på skrå- agar, dekket med olje		56	34	20	-	40	45	-	15	16	-	46	18
Aktivitet ved start:		39	50	46	50	35	54						
Aktivitet etter daglig ompodning								39	57	48	48	44	40

Forsøket viser neppe noen statistisk sikker forskjell på de tre første lagringsmåter, men den første av disse er uten tvil den metode som er mest hensiktsmessig å utføre i praksis. Hverken syrningsaktiviteten eller evnen til aromadannelse var svekket hos noen av de undersøkte kulturer ved denne oppbevaringsmåte. Før bruk må da kulturen tines opp og inkuberes på vanlig måte. De fleste kommersielle kulturer blir idag også levert som frysetørret materiale. Det kan derfor anbefales at meieriene holder et **reservelager** av slike frysetørrede kulturer. For stedeagne kulturer vil en anbefale nedfrysing av nypodet kultur. Disse bør fornyes 2-3 ganger i året.

4.2. Brukssyre. Utstyr og praksis.

Alt etter behovet for brukssyre fremstilles denne på beholdere av varierende størrelse, fra relativt små sårer eller spann til store tanker, utstyrt med automatikk både for pasteurisering og inkubasjon. Til fremstilling av syre i større skala vil syrningstanker av rustfritt stål være å foretrekke, og det finnes i dag gode konstruksjoner av syrningstanker. I tilfelle en nytter spesielle syrningstanker foregår inkubering av syren i tanken, som derfor må utføres slik at inkubasjonstemperaturen kan holdes konstant.

En må stille det krav til slike tanker at de har:

- a) betryggende lukningsanordning og ellers tilfredsstillende alle hygieniske krav,
- b) effektivt rørverk (tilstrekkelig varme/kjøleskapasitet),
- c) pålitelig termoregulering og automatikk forøvrig

Pasteurisering og kjøling i forbindelse med bruk av tanker kan skje i plateapparater. I tanker kan enten omrøringen skje med mekanisk røreverk eller ved pumping.

Da de rustfrie syrningstanker er relativt dyre utstyrsgjenstander blir de vel i dag helst nyttet til fremstilling av forskjellige surmelksprodukter for konsum, mens den syre som nyttes i smør- og ostelagningen fremdeles holdes på vanlige syresåer i allefall på små anlegg.

I våre vanlige syresåer foregår oppvarmingen av melken i vannbad. Vannbadet må også her være laget slik at en hurtig og effektivt kan kjøle melken til syrningstemperatur ved hjelp av kaldt vann. Vann-nivået i beholderen bør kunne reguleres ved hjelp av et overflomsrør, slik at ikke såene flyter opp ved liten fyllingsgrad.

Det vanlige materiale i slike syresåer har hittil hos oss vært aluminium, men rustfritt stål vil nok være et vel så godt egnet, men tyngre og dyrere materiale. Vedrørende såens konstruksjon har en i utlandet laget spesielle lokk som går et stykke ned over såens ytterside og danner vannlås med varme-, respektivt kjølemedium på såens ytterside.

Podning foregår gjennom spesiell åpning i lokket .Omrøring i syremelke under temperaturbehandlingen må en da gi avkall på.

Ved podning av brukssyre kan vanligvis pipetter ikke nyttes p.g.a. volumets størrelse. Det enkleste og sikreste er å helle kulturen over fra modersyrebeholderen etter forutgående flambering eller desinfeksjon av hellekanten med hypokloritt.

Fordelen ved bruk av såer er at en her slipper å fylle syren over på andre beholdere før bruk, den lages ferdig og oppbevares på samme beholder helt til den skal nyttes.

Av hensyn til infeksjonsfaren må en mest mulig unngå å overføre syren fra en beholder til en annen. ^{Melken} bør under hele prosessen, fra pasteuriseringen til den nyttes til podning av ystemelk eller kjernefløte, oppbevares på den samme beholderen.

Med de størrelser en etter hvert får på melieranleggene vil rombehovet for brukssyre bli så stort at syrefremstilling på tank vil tvinge seg frem. I forbindelse med den generelle automasjonsutvikling i anleggene vil også eget røropplegg med automatventiler for fremføring av brukssyre til de respektive forbrukssteder bli vanlig. Slike anlegg vil naturligvis bli utstyrt med helautomatisk kontroll for styring av tid og temperaturforhold under pasteurisering og inkubasjon og i tillegg forsynes med utstyr for elektromagnetisk pH måling, eventuelt med skriver for kontinuerlig registrering av syrningsforløpet. Nedkjøling av brukssyrekulturen kan eventuelt styres via en pH-måleenhet eller via kontaktur eller den kan dobbeltsikres slik at nedkjøling primært skjer på grunnlag av den aktuelle surhetsgrad i kulturen, men hvis det her skulle skje en svikt i systemet vil kjøling i alle tilfelle bli satt igang via tidur etter en viss tid.

Boka es gammel
Ja!

Et opplegg for moderne fremstilling av brukssyre på tank er vist i fig. 4.2.1.

Det er antydnet to alternative podningsmåter enten ved konsentrert kultur som skjer gjennom podestuss med engangs-sprøyte direkte på tank eller med vanlig modersyre (her vil det være aktuelt med mellomtsyre). I siste tilfelle foregår podningen ved å trykke kulturen inn gjennom tankens vaskeledning.

Figur 4.2.1.

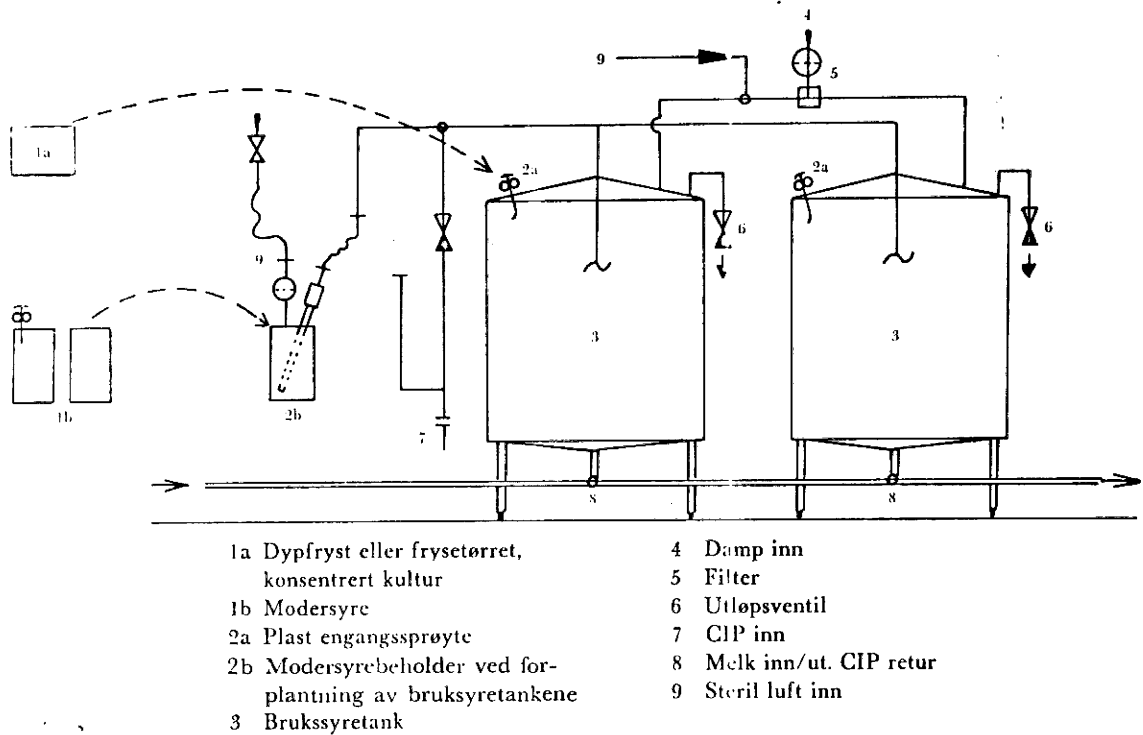
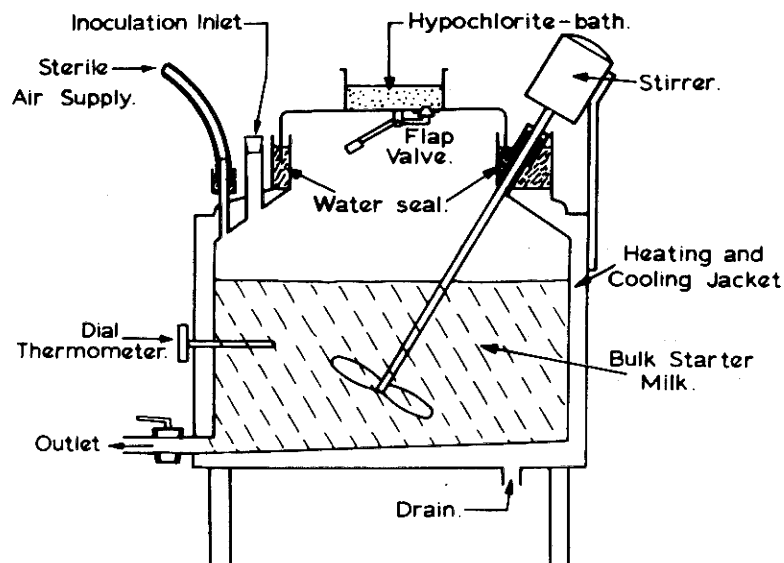


Fig. 4.2.1. Aseptisk fremstilling av brukssyrekulturer, dels ut fra modersyre og dels ut fra direkte poding i brukssyretank.

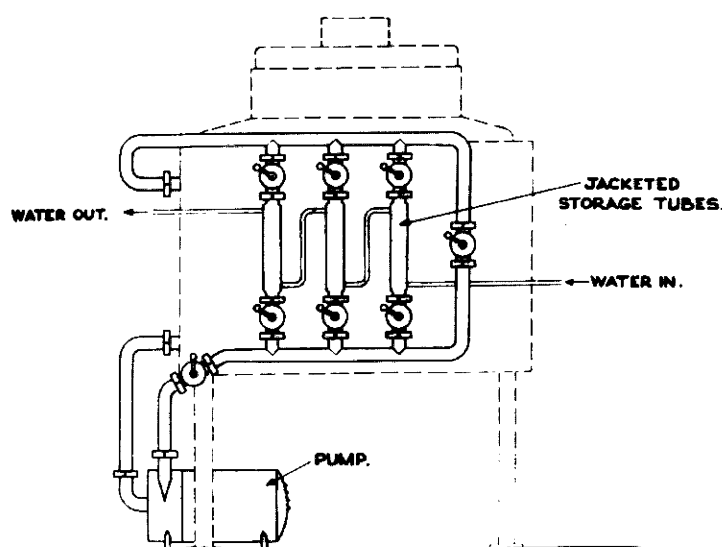
I fig. 4.2.2. har en vist et annet system for aseptisk poding som har vært mye i bruk for brukssyre til Ceddarost. Podningen foregår her manuelt gjennom et bad av hypokloritt.

Fig. 4.2.2.



Til cheddarost-syre har det også blitt gjort forsøk med brukssyre-tanker med såkalt integrert modersyre/podeinnretning som vist fig. 4.2.3. Modersyrebeholderne består av 3 rør med kjølekappe alle med membranventiler i begge ender. Rørene er koplet til et resirkulerings-system for innholdet på tanken. Under pasteuriseringen og kjølingen sirkulerer syremelken gjennom den aktuelle "syrebeholder" til etter at melken er podet. Membranventilene blir så stengt.

Figur 4.2.3.



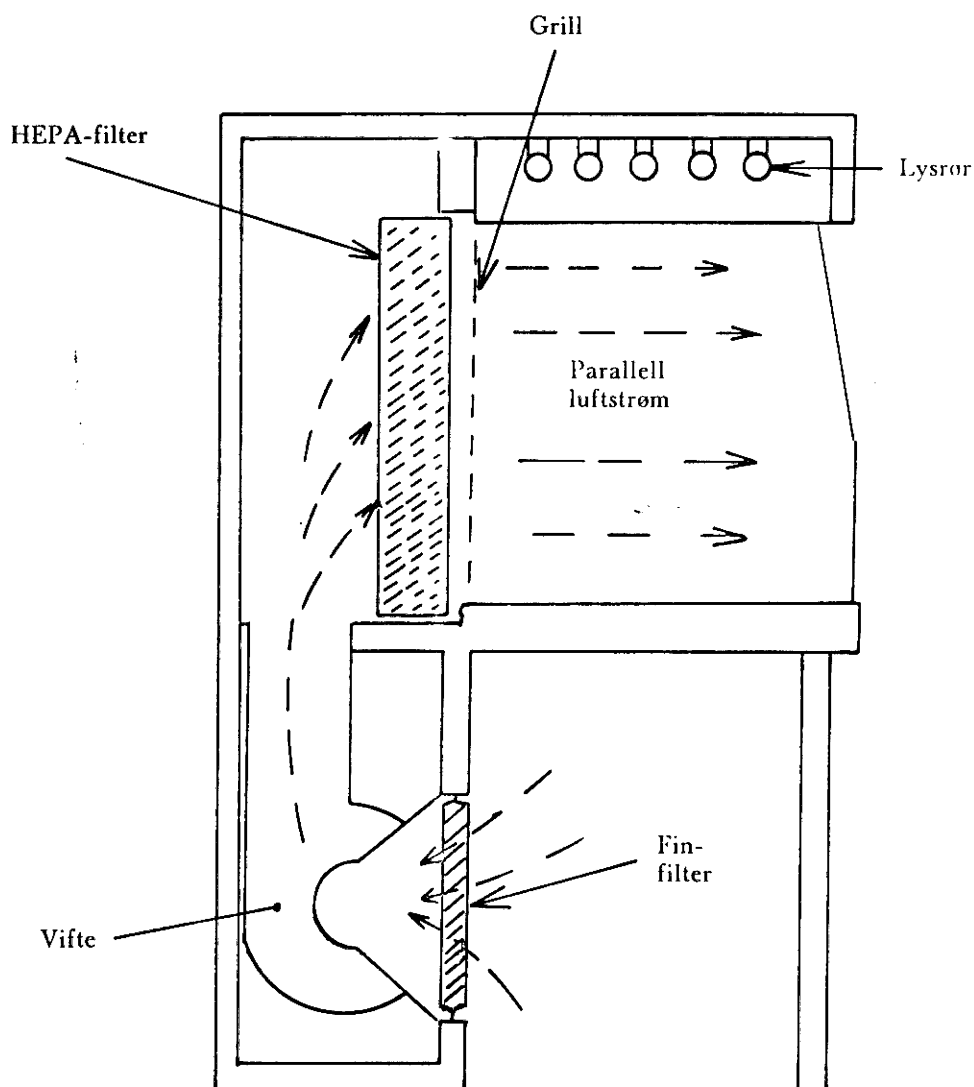
Etter inkubasjon blir denne syremengden nyttet til poding av neste dags syremelk o.s.v. Systemet er interessant men har åpenbare svakheter. Hvilke ?

4.3. Rom for syrelaging.

Lokalene for fremstilling av syrekulturer har vel hittil ikke blitt ofret den oppmerksomhet som de har krav på ved mange meierier. Ved flere eldre anlegg finnes ikke egne syre-rom og syrelagingen er henvist til å foregå i produksjonslokalene. Under slike forhold er det viktig at man velger utstyr som i størst mulig grad kan redusere faren for luftinfeksjon f.eks. ved å nytte et system for aseptisk podning og brukssyretanker med steril-luft-overtrykk.

I mangel av egne syrningsrom kan poding på vanlig måte også foretas i en såkalt miljøbenk som vist i fig. 4.3.1.

Figur 4.3.1.

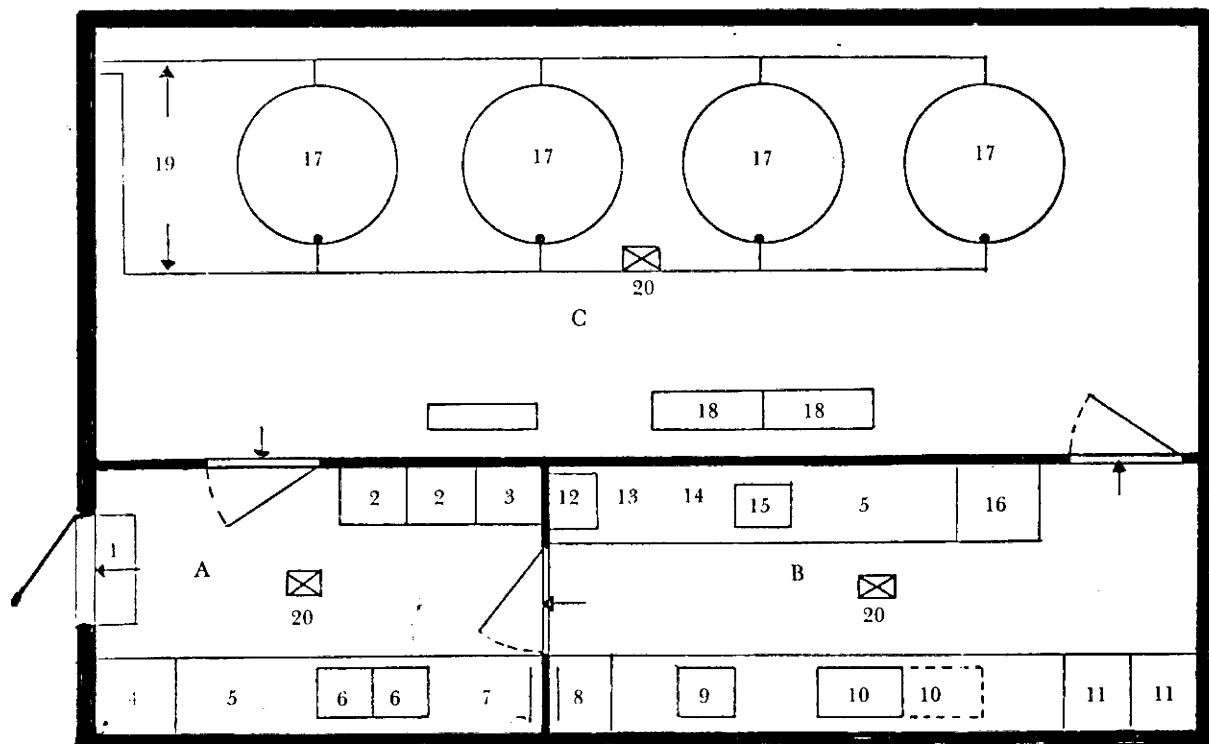


Miljøbenk med horisontal luftstrøm.

Dette er en arbeidsplass som har en laminær filtrert luftstrøm rettet ut mot operatøren og produksjonslokalene der en må vente at infeksjonsfaren er størst. Selv om et slikt arrangement kan virke helt tilfredsstillende vil det vel for nye anlegg være mest aktuelt å velge en planløsning basert på separate syrningsrom både for modersyre og for brukssyre. En slik planløsning er vist i fig. 4.3.2. Denne syreavdelingen består av 3 rom. Ett for modersyre-

behandling, ett for brukssyre og ett felles for-rom som tjener som sluse, vaske og rekvistitarom.

Figur 4.3.2.



SEKSJON A: FORROM

1. Blorbasseng
2. Garderobeskap
3. Rekvisita
4. Lager for skummetmelkpulver
5. Arbeidsplass
6. Vask
7. Plass for glassutstyr

SEKSJON B: MODERSYREROM

8. Gjennomgang med luftlås
9. Skap for sterilisering
10. Modersyrekokker
11. Termostatskap for prøver
12. Vannbad, aktivitetsprøver
13. Titreringsutstyr
14. pH-meter
15. Vask
16. Kjøleskap/fryseskap

SEKSJON C: BRUKSSYREROM

17. Brukssyrekokker
18. Vaskeplass
19. Rørledninger
20. Klorforstøvningsdyse

Plan over moder- og brukssyreavdeling.

De høyeste renhetskrav stilles til modersyrerommet. Dette rommet skal være hermetisk tett og lett å holde rent. Det kan derfor med fordel dekkes med helsveiset vinylplast med avrundete hjørner både på golv, vegger og tak. Rommet utstyres med filtrert luftinntak som gir et overtrykk på ca. 14 mm VS i forhold til forrom og omtrent halvparten av dette i forhold til brukssyrerommet. Alle dører bør slå ut til rom med lavere trykk. Golv og veggbekledning i forrom og brukssyrerom kan med fordel utføres i fliser, mens

man i taket kan greie seg med en god plastmaling. Alle rom utstyres med sprøyforstøvingsanlegg for hypokloritt og de anvendte materialer må da tåle denne behandlingen. Avløpene fra disse rommene utføres i rustfritt stål (med skrulokk i modersyrerommet). De viktigste utstyrs-gjenstander i de respektive rom vil fremgå av fig. 4.3.2.

I forrommet har man plassert et klorbad for desinfisering av fottøy umiddelbart foran utgangsdøren. Alle styre- og kontrollorganer kan med fordel plasseres i forrommet. Det bør nyttes såkalt skjult opplegg for alle elektriske installasjoner.

5. KONTROLL AV SYREVEKKERE.

For å kunne vurdere syrekulturens egenskaper er det nødvendig å gjennomføre et systematisk kontroll-opplegg for kulturtilvirkningen. Denne kontrollen bør omfatte en sensorisk bedømmelse sammen med diverse kjemiske og mikrobiologiske prøver. Følgende prøver vil være aktuelle:

organol.

1. Organoleptiske bedømmelser som omfatter utseende, konsistens, lukt og smak.
2. Fysikalsk-kjemiske prøver som omfatter registrering av surheten i kulturen (d.v.s. aktiviteten) kulturens gassproduksjon, viskositet, acetoin og diacetylbestemmelse, bestemmelse av acetaldehyd og dessuten registrering av syremelkens mangan, citronsyre, tørrstoffinnhold etc.
3. Mikrobiologiske prøver som mikroskopering, bestemmelse av totalantall bakterier, differensiering - lactis/cremoris, citratforgjærere/ikke citratforgjærere og Leucontostoc/diacetilactis. Bestemmelse av såkalte fremmede bakterier, coliforme bakterier, mugg og gjær, samt eventuelle maltaromadannere. Påvisning av syrningshemmende prinsipper som antibiotika, bakteriofager etc.

Fra dag til dag vil det neppe være realistisk å ha et kontrollopplegg som omfatter alt dette, men alle de nevnte prøver vil fra tid til annen være aktuelle for syrekulturer samt for kulturmelkprodukter.

5.1. Organoleptiske bedømmelser.

Som for all sensorisk kvalitetskontroll er det viktig at bedømmelsen skjer under standardiserte betingelser. Temperaturen for eksempel, er en faktor som virker inn både på smaken og konsistensen på kulturen. Eksponeringstiden mot luft er en annen faktor som også kan ha betydning.

Vanligvis gjennomføres smaksbedømmelser av meieriprodukter ved 15-17°C. Dette ville også være en brukbar temperatur for surmelk, men vil forutsette at prøvene blir temperert i vannbad på forhånd. Vanligvis smaksbedømmes syrekulturen etter at den er nedkjølt, men ved lave kjøleromstemperaturer som f.eks. 1-2°C kan det være vanskelig å få noe godt smaksinntrykk. En bør neppe smaksbedømme kulturen ved lavere temperatur enn 6°C og kanskje helst nytte en temperatur på ca. 10°C, hva man vel kan kalle en normal kjellertemperatur.

Det som her er viktig er at forholdet er mest mulig ensartet fra dag til dag. Bedømmes en avkjølt kultur i et temperert rom er det således viktig at bedømmelsen utføres etter en fiksert tid slik at kulturen får den samme temperatur ved hver bedømmelse. Best kontroll over temperaturen i kulturen har man ved oppbevaring event. temperering i vannbad. Ved å holde flere kulturer parallelt får man også et sammenlikningsgrunnlag for den organoleptiske bedømmelsen. Det kan da være lettere å oppdage enkelte særtrekk ved kulturene som man ellers ikke ville kunne registrere.

5.1.1. Utseende.

En vanlig syrekultur skal ha et fast homogent koagel uten nevneverdig myseutskillelse eller gassblærer. Synlige gassblærer vil vanligvis ikke forekomme uten at det er dominans av gassproduserende stammer i kulturen. Løs myse er den vanligste utseende-feil. Litt synereise må faktisk betraktes som normalt, mens mer utpreget væskeutskillelse tyder på fremstillingsfeil f.eks. luftinnblanding, at det er rørt på kulturen i koagulasjonsøyeblikket, for høg inkubasjonstemperatur eller gal varmebehandling av syremelken.

Den alvorligste utseendefeil kulturen kan ha er når den er grynet, tynn og kanskje bare delvis koagulert.

5.1.2. Konsistens.

Etter omrøring skal kulturen ha en jevn, fløyelsaktig, viskøs konsistens. Omrøringen skal være så kraftig at en bryter opp hele koaglet slik at det ikke blir liggende igjen klumper, men heller ikke mer. Når en skal bedømme flere kulturer samtidig er det også viktig at opprøringen skjer likt. Mer og mindre luftinnpisking kan påvirke konsistensen.

Den vanligste konsistensfeilen en har, er at syra er for lite viskøs eller tynn. Dette har med proteinets vannbindingsevne å gjøre. Forutsatt at en har en syremelk med tilfredsstillende tørrstoffinnhold vil årsaken vanligvis være at surhetsgraden ikke er tilfredsstillende d.v.s. for høg pH.

For viskøs eller tykk konsistens forekommer faktisk ikke som feil, men *S.lactis* var. *Helveticus* kan lage mer og mindre seig eller trådtrekkende konsistens på kulturen, dersom den forekommer i denne. For vanlig blandingskultur vil tendens til tråttrekkende

konsistens mest sannsynlig indikere infeksjon av uønskete mikroorganismer. Feilen er skjelden.

Ujevn, klumpet, grynet konsistens forekommer derimot ikke så sjelden. Dersom årsaken ikke er slurvet opprøring av koaglet kan det være snakk om for høg syringstemperatur hvilket kan gi så seigt koagel at det kan være vanskelig å få rørt opp. Årsaken kan også være dårlig fordeling av podemassen eller feil med syremelken. Det kan f.eks. være dårlig rekonstituert tørrmelk eller for lav varmebehandling som er anvendt.

Utseende- og konsistens-feil har gjerne en nær sammenheng.

5.1.3. Lukt og smak.

Alt etter kulturens mikrobiologiske sammensetning (kombinasjon av stammer) kan lukt og smak variere betraktelig mellom de forskjellige kulturer. (Tabell 5.1.3.). Det er derfor umulig å angi en bestemt generell lukt og smaks kvalitet for kulturer. Hovedspørsmålet her er hva kulturen skal nyttes til. For smørproduksjon er det selvsagt ønskelig at kulturen skal ha en fyldig aromatisk smak, men det er tydelig at mange mennesker rent smaksmessig foretrekker en mer rent sur og mindre aromatisk kultur for konsum. Poenget her er å kunne registrere lukt og smaksforandringer som eventuelt kan skje med den enkelte kultur, fremfor alt om det inntreffer smaksnyanser som må karakteriseres som fremmede for vedkommende kultur.

Smaksfeil på kulturen kan ha sammenheng med:

1. Syremelken.
2. Infeksjon av fremmede mikroorganismer.
3. Variasjoner i den normale flora.

Syremelken kan ha smaksfeil som "Førsmak", "Uren smak" og kanskje fremfor alt harsk smak. Slike feil bør registreres før melken nyttes som syremelk og er derfor ikke så interessant i denne sammenheng. Forekommer disse smaksfeil i kulturen må en sørge for å få en bedre syremelk eventuelt nytte tørrmelk av god kvalitet.

Infeksjon av fremmede bakterier i syrekulturen bør selvsagt heller ikke forekomme. Om det forekommer vil imidlertid bare et begrenset antall arter ha utviklingsbetingelser i en aktiv melkesyre kultur. Stort sett er det derfor de mer syretolerante mikroorganismer som

mugg og gjær samt bakterier som selv er aktive melkesyreproduenter, f.eks. Lactobasiller som kan være potensielle infeksjonskilder under kulturarbeidet.

Infeksjon av gjær kan være årsak til "gjærsmak" på kulturen. Unormal høg surhetsgrad kan skyldes lactobasiller. Muggen *Geotricum candidum* kan gi "gammel" smak på kulturmelk, men felles for infeksjøs smaksfeil er at de helst kommer tydeligst frem etter en tids lagring av kulturen. Slike smaksfeil vil derror neppe være særlig fremtredende på helt fersk syrekultur, men dersom det forekommer, indikerer det grove feil i fremstillingsteknikken. Usterile redsaker og for dårlig aseptisk metodikk har vært anvendt.

Endringer i den normale flora i kulturen vil også være den normale årsak til endringer i smaksnyansen i kulturen. Her vil det da vanligvis dreie seg om endringer i balanseforholdet mellom de forskjellige arter og stammer i kulturen, men det kan også tenkes at det har foregått genetiske endringer eller foreligger latente egenskaper hos de "normale" stammer som gjør at smaken kan endre seg. Den smaksfeil som kan trekkes frem som typisk eksempel på dette er maltsmaken som skyldes opphopning av 3-metylbutanol. I følge svenske undersøkelser (1957) synes de maltaromadannende stammer å utvikle seg dårligere enn de normale i sterkt varmebehandlet medium. Sterk varmebehandling av kjernefløte anbefales således. Ved fremkomst av maltsmak i kulturen er vel imidlertid skifting av kulturmateriale den eneste riktige løsning.

Bitter smak skyldes proteinspalting. Noen stammer av *Lactis* kan gi bitter smak, men slike stammer sorteres ut av av syrelaboratoriene og nyttes derfor ikke til kulturer. Bitter smak må derfor mest sannsynlig ha årsak i infeksjon av proteinspaltende mikroorganismer.

Kulturens smak vil generelt være vesentlig påvirket av surhetsgraden, av CO₂-innholdet, og innholdet av diacetyl, acetaldehyd og etylalkohol, som kanskje de viktigste smaksemner, men da lukt og smakssansen reagerer på så uendelige små konsentrasjoner må en regne med at de aktuelle mengder av flere andre stoffskifteprodukter vil være av betydning for smaken uten at forholdet er nærmere klarlagt.

Lindgren, 1957. Om maltsmakbakterier. Sv. Mejeritidn. 49(24):351.

2.

TABELL 5.1.3. EFFEKTER AV KULTURENS SAMMENSETNING (L-SYRER), ETTER LODE/SVENSEN

KULTURENE SATT SAMMEN AV STAMMER		SURHET	P.P.M. ^{Young 24M}		ORGANOLEPTISK BEDØMMELSE				
S.LAC.	S.CREM	LEUC.	OSH	DIACE-TYL	ACE-TOIN	ACETALDE HYD	ETA-NOL	KREATIN-PRØVEN	POENG 1 - 5
A			30	0,1	0	2,7	3,4	-	1
	A		30	0,1	0	3,1	1,4	-	1
A	A		36	0,1	0	3,9	11,5	-	2
A	A	Lc.CREM.	36	0,2	0	2,4	7,6	-	3
A	A	A	37	2,9	108	0	56,6	++	5
A	A	B	35	0,1	0	0	84,6	-	3
A	A	C	36	0,1	0	0	65,1	-	2,5
A	A	D	37	0,1	0	0	85,3	-	2,5
A	A	A	37	6,1	69	0	28,5	++	5
A	B	A	35	4,5	90	0	31,1	++	4
B	A	A	33	2,6	83	1,2	37,6	+	4
B	B	A	32	2,1	41	0	35,4	+	3

Yoghurtsmak, som skyldes opphopning av acetaldehyd er kanskje den smaksfeil som kommer tydeligst frem på grunn av endringer i det mikrobielle balanseforhold i kulturen. Dominans av *S.diacetilactis* fører til at innholdet av acetaldehyd mangedobles den normale mengde. Mens små mengder av acetaldehyd kan virke gunstig på smaken, vil større mengder vanligvis registreres som negativt. I følge Lindsay, (1965) bør diacetyl og acetaldehyd forekomme i mengder som 4:1 for å gi en god avbalansert smak. Blir forholdet mindre enn 3:1 får en yoghurtsmak.

Etter våre undersøkelser synes acetaldehydmengder på mer enn 4-5 mg/l å kunne gi yoghurtsmak i kombinerte syrevekkere. Anderson (1967) fant at i kulturen som hadde acetaldehyds smak kunne *S.diacetilactis* utgjøre opptil 94 % ^{av} aromabakteriene i kulturen.

5.2. Kjemisk-fysikalske prøver.

En viser her til de respektive metodeforskrifter med hensyn til prøvenes utførelse.

5.2.1. Kontroll av surheten.

Dette kan gjøres ved titrering eller pH-måling. En må imidlertid huske på at den aktuelle melkesyremengde ved samme pH-verdi vil kunne variere med melkens bufferkapasitet. Protinet utgjør ca. 70 % av bufferkapasiteten og tørrstoffrik melk vil således gi høg titerverdi i relasjon til pH, mens lavt tørrstoffinnhold betinger en lav titer i relasjon til pH-verdien. Titrering gir derfor et mer direkte mål for den dannede syremengde i kulturen og er den mest vanlige metode for kontroll av surheten i kulturen. Hos oss brukes som kjent ⁰SH som måleenhet d.v.s. ml 0,25 n NaOH pr. 100 ml kultur med fenolftalein som indikator. Sverige bruker ⁰Th som er ml 0,1 n NaOH pr. 100 ml kultur.

Registrering av surhetsgraden gjør det mulig å følge syrningsforløpet under inkubasjonsperioden. Dette er også et mål for celleaktiviteten i kulturen og med henblikk på dette har en utformet den såkalte aktivitetsprøven som baserer seg på den titrerte surhetsgrad i kulturen etter en standard poding, temperatur og inkubasjonstid.

Lindsay, R.C, Day & Sandine, 1965. Green flavor defect in lactic starter cultures. J.Dairy Sci. 48(7):863.

NB!
NB!
NB!

Tabell 5.1.4. Oversikt over organoleptiske anmerkninger og mulig årsaker til feilene.

Utseende og konsistens

- A. Ikke sammenløpt eller tynn.
1. Hemningsfaktorer i syremelken.
 2. Syremelken utilstr. varmebehandlet.
 3. Syremelken ikke podet eller for lite podet.
 4. For lav syrningstemperatur.
- B. Fri myse.
1. For lite tørrstoff i syremelken.
 2. Feil varmebehandling av syremelken.
 3. Rystelse i koagulasjonsøyeblikket.
 4. Luftinnblanding i syremelken.
 5. For høg syrningstemperatur.
- C. Gassblærer i gelet.
1. Dominans av citratforgjærere i kulturen.
 2. Infeksjon av gassdannende mikroorganismer.
- D. Ujevn eller grynet.
1. For lite tørrstoff i syremelken.
 2. Dårlig varmebehandling.
 3. Dårlig fordeling av podemasse.
 4. For høg syrningstemperatur.
 5. Dårlig opprøring av gelet.

Lukt og smak

- A. Definerte smaksfeil.
- Joghurtsmak.
Dominans av *S. diacetylactis/lactis*.
- Gjærsmak.
Infeksjon med gjær.
- Maltsmak.
Fremkomst av *S. lactis* var. *maltigenes*.
- Melkesur, skarp.
1. Dominans av syredannere.
2. Infeksjon med lactobasiller.
- Smakløs, uten aroma.
1. Generell hemning av kulturens mikroorganismer.
2. For lite aromadannelse (manganmangel ved L og DL syre) feil inkubasjonstemperatur og tid, bakteriofager.3. For rask reduksjon av aromastoff til smakløse forbindelser, lavt redokspotensial, dominans av sterkt reduserende stammer.
- B. Mindre definerte feil:
Uren, kvalm, bismak, blåsur, søt.
1. Infeksjon av fremmede mikroorganismer.
 2. Hemningsprinsipper som antibiotika, bakteriofager, vaske- og desinfeksjonsmidler.

NB!

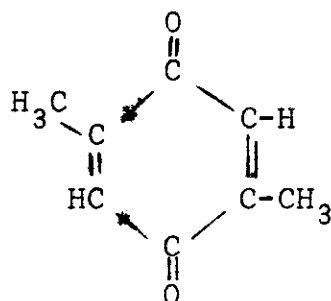
Aktivitetstprøven utføres i Norge med 3 % poding og 4 timer inkubasjon ved 30°C. Økningen i surhetsgraden bør være 16° SH for at en skal kunne karakterisere aktiviteten i kulturen som tilfredsstillende.

Aktivitetstprøven er viktig å utføre som rutinemessig kontroll også på brukssyren og spesielt viktig er denne prøven i forbindelse med ysting.

5.2.2. Kreatinprøven.

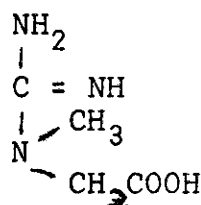
For kombinerte kulturer er kreatinprøven av stor praktisk interesse. Dette er i prinsippet samme reaksjon som nyttes i mikrobiell diagnostikk under betegnelsen Voges-Proskauer's prøve. Selve reaksjonsmekanismen er ifølge Lang (1932) at diacetyl kondenseres til dimetylkinogen og videre til dimetylkinon i alkalisk miljø under avspalting av 2 mol H₂O.

Forat kondensasjonen skal skje må nabogruppen til begge Ketogruppene bestå av CH₂ eller CH₃. (Reaksjonen skjer også med acetylbenzoyl, men ikke med fenantrenkinon eller kamferkinon).



Figur 5.2.2.1.

I følge Lang er det karbonylgruppene i kinogenstrukturen som kondenseres med kreatin (eller andre guanidinderivater.)



Figur 5.2.2.2.

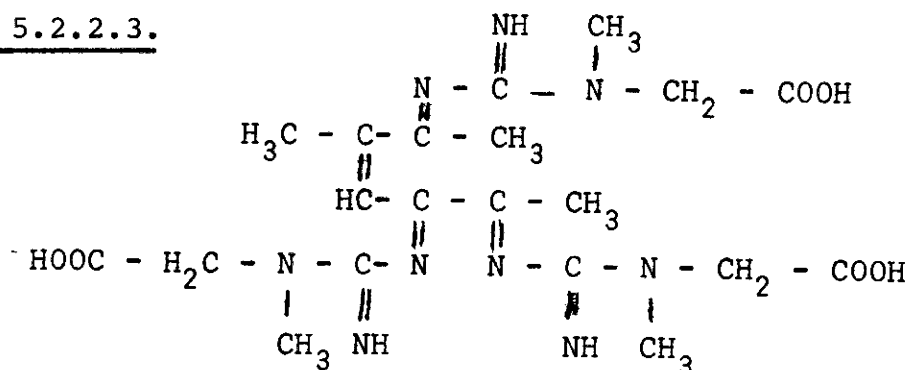
Metyl-eddiksyre-guanidin = kreatin.

Anderson, 1967. Intensifera syraväckarekontrollen. Sv. Mejeritidn. 59(33):450.

Lang, K. 1932. "Über den Mechanismus der Diacetylreaktionen von guanidinen o.s.v. HOPPE SEYLER's Zeitschrift für Physiologische Chemie. Bind 208, 273.

Disse må imidlertid minst ha en fri NH_2 gruppe for at farge-reaksjonen skal dannes, d.v.s. få de konjugerte dobbeltbindinger. Kondensasjonsproduktet for diacetyl-kreatin kan da ha følgende form:

Figur 5.2.2.3.



Det har tidligere gjort seg mange misforståelser gjeldende med hensyn til tolkningen av denne prøven. Betegnelsen "Aromaprøven" bør således ikke benyttes om kreatinprøven. "Acetoinprøven" som den kalles i Sverige er mer logisk, da det i praksis først og fremst er kulturens acetoininnhold prøven forteller noe om, men det er først etter at acetoinet oksyderes opp til diacetyl at man får positive utslag. De diacetylmengder som er tilstede selv i den mest aromatiske syrevekker er imidlertid for lave til at man får positive prøver p.g.a. det aktuelle aromainnhold.

Følgende forsøk av Svensen (1974) viser dette:

Melk som ble tilsatt kjente mengder av diacetyl og acetoin og surgjort med melkesyre viste følgende resultater:

Tabell 5.2.1. Testing av kreatinprøven.

Min. til avlesning	ppm	Diacetyl				Acetoin			Diacetyl + Acetoin		
		0	3	6	9	100	200	300	3+100	6+200	9+300
5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10		0	0	0	0	1	2	0	1	2	
15		0	0	0	0	1	2	3	1	2	3
30		0	0	0	0	1	2	3	1	2	3
	ppm	18	27	36	Butandiol reagerte ikke.						
15 min.		0	1	2							

Oksyderingen av acetoin til diacetyl er avhengig av tiden og lufttilgangen. Gjennombobling av luft vil f.eks. gjøre at prøven blir mye raskere rød og en fiksering av tiden er derfor viktig for å få sammenliknbare resultater og gi prøven verdi. Sterkt positive prøver indikerer et acetoininnhold på 300 mg/l eller mer og all erfaring tilsier da at det er en dominans av *S.diacetilactis* i D og DL-syrevekkere.

Negativ kreatinprøve er ikke ensbetydende med aromaløs syrevekker. For L-syrevekkere eller DL-syrer, der *Leuconostoc* er i dominans (mangantilsetning) vil vanligvis kreatinprøven være negativ selv om slike kulturer ofte har et meget høgt innhold av diacetyl. Dette synes å komme av at acetoininnholdet i slike kulturer heller har en tendens til å reduseres til butandiol enn å oksyderes til diacetyl og at det aktuelle diacetyl- og acetoininnhold i slike kulturer derfor er for lavt til å kunne gi positiv kreatin-reaksjon.

Kreatinprøven utført etter 2, 3, 4 og 5 døgns lagring av kulturen (den såkalte Pettes prøve) kan fortelle noe om hvilken type kultur man har med å gjøre. I D-syrevekkere forblir acetoininnholdet høgt gjennom hele perioden og gir derfor også positive prøver hele tiden.

I DL-syrevekkere og L-syrer vil *Leuconostoc*-stammene normalt redusere acetoininnholdet til butandiol og prøven blir etter hvert svakere positiv eller negativ.

Gjentatt kreatinprøve kan derfor gi opplysninger om reduksjonsevnen i DL-kulturer, men tolkningen av resultatet kan være vanskelig å overføre til praktisk anvendelse.

De aktuelle innhold av C-4-forbindelser lar seg enklest bestemme ad gasskromatografisk vei.

5.2.3. Acetaldehydprøven.

Som en foran har vært inne på vil en dominans av *S.diacetilactis* gjerne føre til en opphopning av acetaldehyd med yoghurt smak til følge. Det er da nærliggende å bruke acetaldehydinnholdet som et mål for en eventuell *diacetylactis* dominans i kulturen.

En enkel kvalitativ metode for påvisning av acetaldehyd (egentlig utarbeidet m.h.p. yoghurtkulturer) kan også nyttes på syrekulturen. Denne bør da være negativ. (På yoghurt skal prøven være positiv).

Syrekulturer som gir positiv acetaldehydreaksjon har enten en meget sterk diacetylactisdominans eller er eventuelt infisert med laktobasiller.

Prøven er for grov til å kunne varsle om en begynnende dominans av *S. diacetylactis* og har derfor kanskje størst praktisk interesse som en supplerende prøve for eventuelt å kunne stadfeste en ubalanse i kulturen.

5.2.4. Kulturens CO₂-innhold.

S. diacetylactis produserer CO₂ ved citratforgjæring mens *Leuconostoc* produserer CO₂ både fra citratforgjæringen og fra den heterofermentative sukkeromsetningen.

Kulturens innhold av CO₂ vil derfor kunne si oss noe om intensiteten i disse stoffomsetninger i kulturen og indirekte noe om innholdet av aromabakterier i syrevekkeren. For en mer eksakt bestemmelse av CO₂ i kulturer kan nyttes Warburgteknikk, men i praksis har man lansert den enkle, såkalte utrysningsprøven, der man foretar en dobbelt titrering av kulturen: En prøve hvor titeren tas umiddelbart og en annen prøve som titreres etter at kolben har vært rystet godt under oppvarming til 80°C slik at CO₂-gassen drives ut. Differensen mellom de to titerverdier gir da et uttrykk for CO₂-innholdet.

Waagner Nielsen (1968) angir følgende verdier som typiske for en dansk aromatisk syrevekker.

Tabell 5.2.2. CO₂-titer i syrevekker.

Timer etter poding	ml 0,1 n NaOH pr. 100 ml kultur		
	Titer straks.	Etter utrysting	Differens CO ₂ -titer.
0	20	20	0
2	21	21	0
6,5	25	22	3
9,5	34	30	4
13	55	40	6
15	75	66	9
18	95	84	11
20	101	88	13
22 (pH 4,6)	108	92	16

Lode (1974) har undersøkt utrustningsprøven systematisk på 6 forskjellige syrekulturer og samtidig bestemt antall citratforgjærere og totaltallet bakterier i kulturen. Resultatene fra denne undersøkelsen tyder på at L-syrer kan gi noe høyere CO₂-titer enn DL-syrevekkere. Tilsammen ble 232 prøver av de 6 kulturene utført. Resultatet for alle kulturer under ett er vist i tabell 5.2.3.

Tabell 5.2.3. CO₂-titer og citratforgjærere.

Citratforgjærere i prosent av total	Antall prøver.	Prøver med CO ₂ -titer over 10°SH .x)
mindre enn 10	75	24 (32 %)
mellom 10 og 30	114	72 (63 %)
over 30	43	32 (74 %)

x) CO₂ titre fra 3,8 - 15,2°SH.

Utrustingsprøven er som en skjønner en lite eksakt metode, men kan under praktiske forhold gi en ganske god pekepinn om balansen mellom citratforgjærere og syredannere i kulturen. Ved særlig høge CO₂-titerverdier kan det være grunn til å anta at *Leuconostoc* som gruppe har kommet i dominans. En høy CO₂-titer, men negativ acetaldehydprøve kan til eksempel ytterlig styrke en slik antagelse.

5.2.5. Kontroll av citratomsetningen.

Omsetningen av citratet i kulturen skjer med noe forskjellig hastighet for D-og L-syrevekkere. Tidspunktet for totalforgjæringen av citratet i kulturen kan enkelt bestemmes ved en kvalitativ fargereaksjons-test.

Prinsippet er at citronsyre i protinfritt melkefiltrat i nærvær av eddiksyreanhydrid og pyridin danner en sterkt gulfarget forbindelse.

Waagner Nielsen, 1968. Aromabakterienes kuldioxiddannelse i syrevækkere og ost. Nordisk Mejeritids. 34(10):198

Lode, 1974. Under utgivelse. Melding nr. 191 fra Meieriinst.

Dersom ikke alt citrat i kulturen er forgjært vil man således få positiv (gul) prøve.

Normalt bør alt citrat uansett kulturtype være forgjæret etter ett døgn ved 20°C. Tas prøven gjentatte ganger gjennom inkubasjonsperioden kan man avgjøre når citratet i kulturen er ferdigforgjæret og således få en idé om det hovedsakelig har vært Leuconostoc-forgjæring eller diacetylactisforgjæring av citratet som har foregått.

Prøven har størst betydning som supplerende kontrollprøve.

5.2.6. Konsistensmåling - viskositet - fasthet.

Ved den organoleptiske bedømmelse av kulturen får en et ganske godt bilde av kulturens konsistensegenskaper, men i den rutinemessige kontroll av kulturen kan det likevel være hensiktsmessig å registrere objektive verdier som kan gi et bilde av konsistensen. I praksis har man ingen målemetode for et så sammensatt begrep som konsistens, men en rekke instrumenter for måling av fasthet og viskositet foreligger. Disse egenskaper er sterkt korrelerte med konsistensen og kan nyttes som "mål" for denne.

Det instrument som i praksis har fått størst anvendelse til registrering av viskositeten i syrevekkere og kulturmelk er S.M.R.'s viskosimeter (1956) som er et gjennomstrømnings-viskosimeter der en registrerer den tiden et bestemt volum tar for å passere en kjent åpning ved fritt løp. Dette kan bare nyttes på opprørt kultur. Rotasjonsviskosimetre f.eks. av typen Brookfield kan benyttes såvel på uopprørt koagel som på opprørt kultur. Dette er imidlertid betydelig dyrere instrumenter.

gj nest brukt
S.M.R-viskosimetret er utstyrt med uskiftbare spisser med forskjellig diameter. Spiss nr. 3 (3 mmØ) er den som vanligvis egner seg best til syrevekkere og vanlig kulturmelk. Gjennomstrømningstiden med denne kan variere fra ca. 50 til 90 sek.

For særlig viskøse kulturer som f.eks. yoghurt, rømme og tette-melk må det nyttes større gjennomstrømningsåpninger, enten 4 eller 6 mm.

NB Alle målinger av viskositet må skje ved samme temperatur for at man skal få sammenliknbare resultater. Klumper i opprørt masse er aktuelle feilkilder. Gelet må være godt opprørt for at prøven skal ha noen verdi.

5.3. Mikrobiologisk kontroll

Hensikten med den mikrobiologiske kontroll er å kunne få frem et mer detaljert bilde av mikrofloraen i kulturen, enn det som indirekte går frem av de mer enkle kjemiske kontrollprøver. Ved fremkomst av infeksjoner og andre produksjonsvansker vil i de fleste tilfeller bare en mer inngående mikrobiologisk analyse av produktet kunne klarlegge årsaksammenhengen. Selv om de fleste meierier mangler utstyr til gjennomføring av mer krevende analyser er det likevel muligheter til å utføre en viss kontroll med enkle hjelpemidler.

I denne sammenheng må en ikke glemme mikroskopet. Flere mikroorganismer er morfologisk så forskjellige fra melkesyrebakteriene at de lett kan påvises i mikroskopet. Mugg og gjærinfeksjoner i kulturen vil således vanligvis kunne registreres i mikroskopet. Gjær og mugg vokser som kjent godt i surt miljø og kan komme over i kulturen som luftbåren infeksjon.

I dag er det gode muligheter til å skaffe seg ferdiglagete spesialsubstrater fra sentrale laboratorier for mer selektivt å bestemme de forskjellige typer av mikroorganismer i kulturen. Har ikke meieriet utstyr til å utføre spredninger bør prøver av kulturen sendes inn til analyse, men her får man straks problemer med tidsfaktoren, emballeringen og forsendelsen av det levende materiale.

Prinsipielt bør derfor meieriene være utstyrt med det nødvendige utstyr for å kunne foreta spredninger på fast og flytende media. Følgende prøver og media er aktuelle:

5.3.1. Total-tallet Eugonagar eller PCA.

I en utvokst kultur vil totaltallet bakterier være av størrelsesorden 0,5 - 2 milliarder/ml.

5.3.2. Citratforgjærere Kalciumcitratagar etter Nickels & Leesment.

Med dette medium bestemmer en både Leuconostoc og S. diacetylactis i kulturen, men en viss differensiering kan gjøres mellom disse to på grunnlag av utveksttid og sonestørrelse. Vanligvis utvikler S. diacetylactis de største oppklaringssoner og kommer først tilsyne på platen. Mediet kan gjøres selektivt for leucobostoc ved å hemme diacetylactis med penicillintilsetning.

5.3.3. Differensiering mellom S. lactis og S. cremoris

Differensiering mellom S. lactis og S. cremoris kan gjøres på spesialagar etter Reddy et al. (1969) der S. cremoris gir gule kolonier, men S. lactis gir hvite kolonier.

5.3.4. Mugg og gjær

Potet-dextroaeagar eller lignende agar surgjort til pH 3,5. Prøven må være negativ eller mindre enn 1 pr. ml kultur.

5.3.5. Coliforme og fremmede organismer

Coliforme organismer påvises på rødfiolet galleagar.

Såkalte fremmede bakterier bestemmes på kjøttekstraktpeptonagar. Begge prøver skal selvsagt være negative på syre-vekkere.

Reddy, Vedamuthu, Washam & Reinbold, 1969. Differential agar medium for S. lactis and S. cremoris. Applied Microbiology, 18 (5): 755.

5.3.6. Lactobasiller

Infeksjon av lactobasiller i syrekulturen kan enkelt påvises ved å gi kulturen en fornyet inkubasjon ved 37 - 40° C. Eventuelt lactobasilleinfeksjon vil da gi seg til kjenne ved at det skjer en vesentlig økning i melkesyreinnholdet, dvs. den titrerte surhetsgrad øker (inntil 60 - 70 - 80° SH).

5.3.7. Påvisning av maltaromadannere

Pasteurisert skummet melk tilsatt 1 % steril gjærautolysat podes med 1 % suspekt syrekultur som har fått en ekstra inkubasjon i 18 timer ved 37° C. Kulturen inkuberes ved 30° C i ett døgn og undersøkes med hensyn på karamell-likne lukt etter ett, eventuelt to døgn (dersom kulturen ikke er koagulert etter ett døgn). Eventuell lukt av karamell er sterkest umiddelbart før koagulasjon.

5.3.8. Klarlegging av årsaker til syrningssvikt

Syrningshemmende prinsipper kan være av forskjellige slag, som f.eks. antibiotika eller vaske- og desinfeksjonsmiddelrester i syremelken. Det kan skyldes ufullstendig inaktivering av melkens originære hemningsstoffer, men det kan også skyldes bakteriofagangrep på mest syrningskative stammer i kulturen.

På grunn av bakteriofagenes stammespesifitet er det ikke mulig i blandingskultur å utføre enkle prøver som med sikkerhet kan gi en opplysning om syrningssvikten skyldes bakteriofager. For å kunne avgjøre dette må man disponere renkultur av den mottakelige stammen.

I praksis vil gjerne et fagangrep manifestere seg med et angrep på den mest syrningsaktive stamme i blandingskulturen og under slike forhold vil testing på vedkommende kultur likevel kunne gi tilfredsstillende resultat.

Dersom et sterilfiltrat fra en hemmet kultur podet på en ny kultur gir ny hemning når filtratet ikke er varmebehandlet, men ingen hemning dersom det er varmebehandlet, indikerer dette at bakteriofager er tilstede i sterilfiltratet (metode for dette er gitt i øvningsforskriftene). Dette kan imidlertid også være et annet kjemisk termo-labilt hemnings-stoff, men dette er mindre sannsynlig dersom syremelken har vært tilstrekkelig varmebehandlet. Dersom prøven kan gjentas etter flere ompodninger uten at noen fortynnings-effekt kan registreres, vil en måtte gå ut fra at en har med bakteriofager å gjøre.

