

# RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

## Over rationeele stremselbereiding en stremselbewaring

DOOR

Dr. B. J. HOLWERDA.

(Ingezonden 24 Januari 1923).

Het is herhaaldelijk voorgekomen, dat stremseloplossingen, die niet alkalisch reageerden en niet door schimmels waren aangestast, bij het gebruik in sterkte achteruitgegaan bleken te zijn. Eenige voorbeelden, aan de praktijk ontleend, die betrekking hebben op stremfels van dezelfde afkomst kunnen hiervan het best een indruk geven. De stremfels in tabel I aangehaald waren alle afgeleverd op een sterkte van 12 000.

Tabel I.

Nummer.	Tijd verlopen tusschen ontvangst en onderzoek.	Sterkte.
3	24 dagen	8400
5	24 "	9700
7	± 17 "	9200
14	19 "	6700

De vraag is nu tot het Proefstation gericht, wat de oorzaak van een achteruitgaan der stremfels, onder voor zoover bekend niet schadelijke omstandigheden, kon zijn en hoe dit zou kunnen worden voorkomen. Dit en de betrekkelijk mysterieuse verschijnselen, die zich bij de stremselbereiding nog steeds voordoen is de aanleiding geweest tot het volgende onderzoek.

De stremseloplossingen, die verkregen worden door gedroogde kalfsmagen te extraheeren, vertoonen bij de bereiding gewoonlijk gedurende eenigen tijd een vooruitgang van de stremmende werking. Dit is hieraan toe te schrijven, dat een gedeelte van het enzym in onwerkzamen toestand in het extract voorkomt, als

2082391



proferment of zymogen, dat nog geactiveerd moet worden om stremmend te kunnen werken.

Zooals bekend, kan door matige temperatuursverhooging (tot 37° C.) of door te extraheeren met een weinig aangezuurde vloeistoffen deze periode van vooruitgang belangrijk worden verkort. Het was dus wenschelijk te onderzoeken:

1°. Hoe zuur een proferment bevattend extract kan worden gemaakt bij een bepaalde temperatuur zonder het enzym door te hoogen zuurgraad te beschadigen.

2°. De invloed van den zuurgraad op de snelheid, waarmee het proferment in ferment wordt omgezet.

3°. De invloed van den zuurgraad, die geschikt is om het proferment te activeeren, op de stabiliteit van de stremseloplossing bij langdurige bewaring (bijv. 2 à 3 maanden).

Bij een onderzoek naar de stabiliteit enz. van fermenten in verband met den zuurgraad, heeft men zich met de reële aciditeit, de waterstofionenconcentratie van de vloeistof bezig te houden. Behalve, dat ook het gevaar van beschadiging van stremseloplossingen door te groote alkaliteit in te hooge hydroxylionenconcentratie moet worden gezocht <sup>1)</sup>, zijn in het algemeen de bestaansvoorwaarden van enzymen ten nauwste verbonden met de waterstof- of hydroxylionenconcentratie van hun oplossing. Een overschrijding van het stabiliteitsgebied naar den zuren of den alkalischen kant veroorzaakt een beschadiging van het ferment. De uitkomsten der onderzoekingen van LÖRCHER <sup>2)</sup>, FUJIO <sup>3)</sup> en HEDIN <sup>4)</sup> over de activeering van proferment bevattende leblopsingen zijn, omdat deze schrijvers zich, voor zoover het den zuurgraad betreft, bezig houden met de titreeraciditeit der vloeistoffen, voor het boven uiteengezette doel niet bruikbaar.

Daar het volgende onderzoek dus voor een groot deel betrekking zal hebben op waterstofionenconcentraties heb ik deze zooals thans algemeen gebruikelijk is, niet als zoodanig aangegeven, als  $C_H$ , doch als  $P_H$  <sup>5)</sup>

1) VAN DAM. Deze verslagen VII (1910).

2) Pfügers Archiv 69, 141 (1893).

3) Ergebn. d. Physiol-Biochem 1, 468 (1902).

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie 72, 187 (1911).

5) Waterstofionenconcentraties worden bepaald door meting van electromotorische krachten. Het verband, dat tusschen de laatste en de eerste bestaat bij een bepaalde temperatuur, wordt uitgedrukt door de volgende vereenvoudigde vergelijking:

$$\frac{\text{Elect. mot. kracht}}{\text{constante}} = \log \frac{1}{C_H}$$

Door deeling van de bij de meting gevonden electromotorische kracht door een constant getal, vinden we de waarde voor  $\log 1/C_H$ , waaruit die voor  $C_H$  berekend kan

De gevoeligheid van een enzymoplossing voor de reële aciditeit is ook gewoonlijk afhankelijk van de mate van zuiverheid en de sterkte; geëxtraheerde bijstoffen kunnen zeer beschermend op het enzym werken. Er is bij het volgend onderzoek naar gestreefd om oplossingen te krijgen, die zooveel mogelijk met die uit de praktijk te vergelijken waren. Als uitgangsmateriaal dienden gedroogde handelsmagen (Hollandsche, Russische, Poolse en Oostenrijksche). Geëxtraheerd werd  $\pm 24$  uur bij kamertemperatuur met een 10 pct. keukenzoutoplossing, waaraan soms 2 pct. boorzuur werd toegevoegd. Het evenwicht tusschen kalfsmaag en extractievloeistof is na 24 uur bereikt. Ik zal hierop later nog terugkomen. Daarna werd door papier of glaswol gefiltreerd; voor sommige proeven was het wenschelijk om steriele extracten te hebben. Daar sterilisatie van een fermentoplossing niet op de gewone wijze door verwarming kan geschieden werd in deze gevallen door een Chamberlandkaars gefiltreerd. Bij de zoo verkregen steriele extracten was bederf door schimmel dus uitgesloten; echter gaat de sterkte van de enzymoplossing door deze bewerking belangrijk achteruit, ook worden door de kaars veel eiwitachtige stoffen tegengehouden; het is dus niet onmogelijk, dat de kaarsfiltraten wat minder weerstand zullen hebben tegen schadelijke invloeden dan gewone stremfels.

De sterktebepaling van de stremfels geschiedde op de gebruikelijke wijze in een waterthermostaat ( $30^{\circ}$  C.). Echter werd aan slechts 0,1 c.M<sup>3</sup>. stremfel 25 c.M<sup>3</sup>. melk toegevoegd. Deze kleine hoeveelheid stremfel werd gebruikt om invloed van het toegevoegde zuur aan de stremfeloplossing of van het zoutgehalte ervan, op den stremtijd uit te sluiten. De waterstofionenconcentraties werden electrometrisch bepaald. Op de z.g. zoutfout, die gemaakt wordt bij het meten in oplossingen van een dergelijk hoog (10 pct.) zoutgehalte wordt later nog teruggekomen.

Uit eenige voorproeven bleek, dat de activeering van proferment bevattende oplossingen bij  $P_H = 4,70$  ( $25^{\circ}$  C.) ongeveer drie dagen duurde; bij  $P_H = 5,30$  aanmerkelijk langer; de stremtijden van een zymogen bevattende vloeistof die op  $P_H = 4,25$  of  $3,90$  was gebracht begonnen na eenige uren al onregelmatig te worden, wat op beschadiging door te veel zuur wees. Tevens bleek uit

---

worden. Deze berekening laat men echter achterwege en neemt de waarde van  $\log 1/C_H$  die men dan  $P_H$  noemt als maat voor den reëlen zuurheidsgraad aan. Men doet dit niet alleen ter wille van de eenvoudige berekening, maar deze uitdrukkingswijze biedt ook in andere opzichten onmiskenbare voordeelen aan. Ter wille van de duidelijkheid is in de vroeger van dit proefstation uitgegane publicaties steeds de H-ionenconcentratie zelf ( $C_H$ ) aangegeven geworden. Waar men in de biochemische literatuur bijna steeds  $P_H$  waarden vindt vermeld, meenen wij goed te doen, ons daarbij aan te sluiten. Men moet zich echter eenigermate gewennen aan de omstandigheid, dat *hoogere* zuurheidsgraden ( $C_H$ ) dus uitgedrukt worden door *lagere*  $P_H$  waarden. De H-ionenconcentratie van melk is b.v.  $\pm 3 \times 10^{-7}$ , de waarde van  $P_H$  wordt dus  $\log. 1/3 \times 10^{-7} = 6,52$ . Voor de veel zuurdere kaasmassa is  $C_H = 10^{-5}$  norm.; de waarde van  $P_H$  is in dit geval 5.

de voorproeven, dat de omzetting proferment ferment niet monomoleculair verloopt, wanneer een door middel van NaCl-oplossing verkregen maagextract een weinig wordt aangezuurd. Het zou dus niet mogelijk zijn van een goed gedefinieerde snelheid van omzetting te spreken, deze bleek n.l. op verschillende tijdstippen van de omzetting niet dezelfde te zijn.

Door eenige series activeeringsproeven op de volgende wijze uit te voeren, was het mogelijk in het bovengenoemde punt 1 en punt 2 een inzicht te verkrijgen. Op vier achtereenvolgende dagen werden gedeelten van een, zonder toevoeging van zuur gemaakt, maagextract met HCl op verschillenden zuurgraad gebracht en in een thermostaat bij 25° C. bewaard. Het niet aangezuurde gedeelte van het extract werd in de ijskast bewaard; de activeering bij deze lage temperatuur en lagen zuurgraad is dan zeer gering. Bij aanzuren ontstond in de stremfels een geringe troebeling; daarom werd aan de vloeistof, die zoo koud mogelijk werd gehouden om de activeering gering te doen zijn en de kans op mogelijke beschadiging door te zure reactie uit te sluiten snel zoveel zuur toegevoegd dat de optredende troebeling kon worden afgecentrifugeerd. Daarna werden snel gedeelten van het zure extract door middel van boraxoplossing op verschillenden zuurgraad gebracht. Er is herhaaldelijk gecontroleerd, dat ondanks de eenigszins ingewikkelde manipulatie een bepaalde aciditeit op de verschillende dagen goed reproduceerbaar was. Dit zal wel aan de sterke bufferwerking van de oplossingen zijn toe te schrijven. Gedurende vier dagen werd dus iederen dag een gedeelte neutraal extract uit de ijskast op verschillende zuurgraden gebracht. Van iederen onderzochten zuurgraad hadden we na 4 dagen dus 4 extracten; deze waren één, twee, drie en vier dagen bij 25° C. aan de werking van dien bepaalden zuurgraad onderworpen geweest. De stremtijden van alle porties van een extract werden na 4 dagen alle met dezelfde melk bepaald. De invloed van den zuurgraad en van den duur van de inwerking is dan direct uit de stremtijden af te lezen. (Tabel II).

De stremtijden zijn in seconden aangegeven, de met eenzelfde letter aangeduide extracten zijn van eenzelfde partij kalfsmagen afkomstig.

Uit de cijfers in horizontale lijn kan men dus den invloed van een bepaalden zuurgraad bij een inwerkingsduur van één tot 4 dagen nagaan. Uit de stremtijden in verticale rij blijkt de invloed van verschillenden zuurgraad bij even lange inwerking.

Uit de cijfers van tabel II volgt, dat de activeering zeer langzaam gaat bij 25° C. wanneer  $P_H > 5$ ; aan den anderen kant is een meer zure reactie dan  $P_H = 4,70$  gevaarlijk voor het enzym. Het activeeringsgebied is voor de gesteriliseerde extracten hetzelfde als voor de niet gesteriliseerde; ook de toevoeging van boorzuur oefent geen invloed uit; evenmin als de sterkte van de stremseloplossingen.

Tabel II.

*Activeering van proferment bevattende oplossingen bij 25° C.*

Opm. betr. de extractie vloeistoffen enz.	Sterkte.	Nummer.	P <sub>H</sub>	Stremtijd van de zure oplossing na dagen			
				1.	2.	3.	4.
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	10200	A I	5,72	206	206	196	192
		A I	5,37	182	180	162	160
		A I	4,86	146	146	145	145
		A I	4,47	149	162	161	169
		A I	3,78	341	398	426	481
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	8200	A II	4,95	238	228	215	207
		A II	4,56	207	208	214	235
		A II	4,30	255	271	280	296
		A II	4,15	267	280	338	337
		A II	3,90	383	—	—	493
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	8500	B I	4,98	290	253	225	225
		B I	4,58	224	238	249	251
		B I	4,40	231	256	261	281
		B I	4,27	231	282	288	311
		B I	3,96	341	—	484	500
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	5200	B II	5,40	497	450	442	412
		B II	5,01	376	—	288	—
		B II	4,86	310	271	273	272
		B II	4,62	271	274	279	277
		B II	4,37	285	295	322	323
		B II	4,11	313	375	405	402
		C I	4,99	240	216	219	189
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	7700	C I	4,66	191	198	194	195
		C I	4,30	200	236	244	289
		C I	4,13	231	311	389	451
		C I	3,79	321	464	499	600
		C II	5,52	498	466	425	376
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	6650	C II	5,05	380	359	319	249
		C II	4,70	225	228	225	226
		C II	4,32	225	227	234	234
		C II	4,09	238	255	277	282
		D I	4,75	231	212	214	211
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	6900	D I	4,53	230	220	236	235
		D I	4,28	234	248	269	294
		D I	4,06	260	295	327	379
		D I	3,90	297	359	428	451
		D II	5,52	—	309	—	283
10 pct. NaCl gesteriliseerd .	5700	D II	4,76	227	—	222	221
		D II	4,23	254	281	286	309
		D II	4,00	286	315	323	444
		D II	3,88	300	314	328	505
		A III	5,52	179	178	170	155
10 pct. NaCl niet gesteriliseerd	14200	A III	5,08	140	123	112	106
		A III	4,79	102	104	105	105
		A III	4,40	105	113	126	130
		A III	4,18	141	157	183	195
		A III	4,06	165	191	226	236
		E I	5,71	155	153	144	144
10 pct. NaCl + 2 pct. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> niet gesteriliseerd.	16300	E I	5,54	149	142	127	127
		E I	5,32	133	124	105	93
		E I	5,10	109	95	95	92
		E I	4,89	86	84	82	83
		E I	4,67	81	82	90	95
		E I	4,49	83	88	98	107

Het bepalen van het geschikte activeeringsgebied bij 37° C. in plaats van bij 25° C. is om deze redenen niet met extracten van zooveel verschillende partijen kalfsmagen uitgevoerd en slechts met niet gesteriliseerde, boorzuur bevattende extracten. De resultaten zijn in tabel III vermeld.

Tabel III.

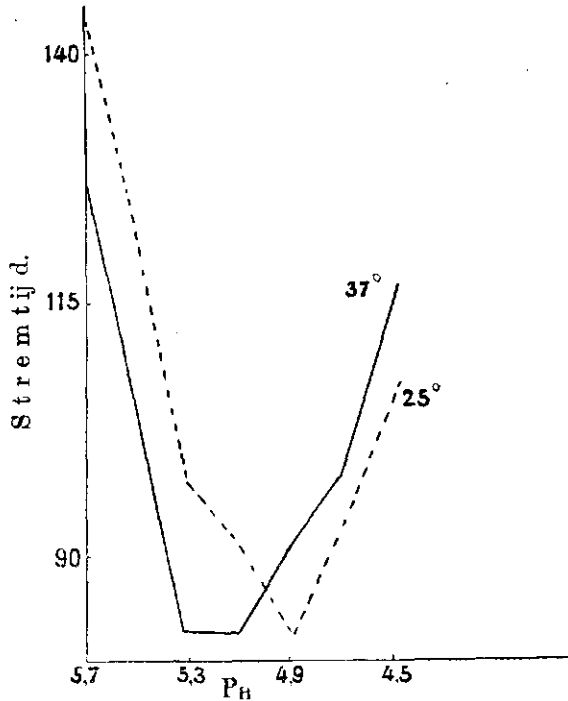
*Activeering van proferment bevattende oplossingen bij 37° C.*

Opm. betr. de extractie vloeistoffen enz.	Sterkte.	Nummer.	P <sub>H</sub>	Stremtijd van de zure oplossing na dagen			
				1.	2.	3.	4.
10 pct. NaCl + 2 pct. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> niet gesteriliseerd.	9750	F I	5,81	293	240	—	234
		F I	5,16	125	—	126	125
		F I	4,74	127	134	154	173
		F I	4,44	141	164	176	—
		F I	4,25	180	229	264	290
10 pct. NaCl + 2 pct. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> niet gesteriliseerd.	16300	E I	5,71	145	141	127	127
		E I	5,54	137	128	111	110
		E I	5,32	117	109	90	83
		E I	5,10	91	83	84	82
		E I	4,89	81	81	85	91
		E I	4,67	82	82	98	98
		E I	4,49	92	93	123	117

Duidelijk blijkt uit de cijfers, dat het geschikte activeeringsgebied zich bij 37° iets naar den minder zuren kant heeft verschoven; b.v. voor het extract EI is P<sub>H</sub> = 4,89 bij deze temperatuur na 4 dagen al wat schadelijk; terwijl voor dit extract deze zuurgraad niet schadelijk was bij 25° C. Het goede activeeringsgebied blijkt bij 37° ongeveer tusschen P<sub>H</sub> = 5,10 en P<sub>H</sub> = 5,30 te liggen. In figuur I zijn 2 seriesuitkomsten graphisch voorgesteld. De stremtijden van gedeelten van extract EI, die 4 dagen zoowel bij 25° als bij 37° onder invloed van verschillende aciditeit zijn geweest, zijn daarin aangegeven. Het zou kunnen zijn, dat bij zuur maken met een ander zuur dan HCl andere stabiliteitsgrenzen voor het ferment werden gevonden; hoewel al gebleken is, dat boorzuurtoevoeging geen invloed heeft. Wij hebben daarom ook proeven genomen met phosphor- en melkzuur. Het geschikte activeeringsgebied van proferment bevattende extracten bij aanzuren met deze zuren werd op een eenigszins andere wijze opgespoord. Aan gelijke hoeveelheden van een boorzuur-zoutoplossing werden verschillende hoeveelheden phosphorzuur of melkzuur toegevoegd. Daarna werden gelijke hoeveelheden goed fijn verdeelde kalfsmaag met eenzelfde hoeveelheid van deze vloeistoffen van toenemende aciditeit geëxtraheerd gedurende 4 dagen bij 25° C.; daarna werd gefiltreerd. De reële aciditeit van het extract, gemaakt met een boorzuur-zoutoplossing zonder toevoeging, zal in het algemeen niet hoog genoeg zijn om dit extract na 4 dagen bij 25° C. al geheel te activeeren. Een geringe zuurtoevoeging zal noodig zijn, terwijl

te veel weer schadelijk is. De stremtijden van een serie extracten, gemaakt met boorzuur-zoutoplossingen van toenemende aciditeit, zullen dus een minimum vertoonen. De uitkomsten van eenige series proeven met magen van verschillende herkomst, op deze wijze uitgevoerd, zijn in tabel IV vermeld; de stremtijden zijn weer in seconden aangegeven.

Fig. I.



Tabel IV.

Aantal c.M <sup>3</sup> . N. melkzuur toe- gev. aan 100 c.M <sup>3</sup> . extr. vloeistof . . . . .	—	1,4	2,6	3,2	—	—	—	—
Stremt. filtraat A na 4 dagen bij 25° C. . . . .	74	62	75	83	—	—	—	—
P <sub>H</sub> . . . . .	5,30	4,95	4,64	4,55	—	—	—	—
Aantal c.M <sup>3</sup> . N. melkzuur toe- gev. aan 100 c.M <sup>3</sup> . extr. vloeistof . . . . .	—	0,2	1,0	1,2	1,4	1,8	3,6	—
Stremt. filtraat B na 4 dagen bij 25° C. . . . .	113	103	98	101	109	119	208	—
P <sub>H</sub> . . . . .	4,96	—	4,91	4,83	—	—	4,10	—



Aantal c.M <sup>3</sup> . N. melkzuur toegev. aan 100 c.M <sup>3</sup> extr. vloeistof . . . . .	—	0,4	0,8	1,6	2,4	3,2	—	—
Stremtijd filtraat C na 4 dagen bij 25° C. . . . .	179	123	103	124	209	354	—	—
P <sub>H</sub> . . . . .	5,35	—	4,86	4,52	—	4,10	—	—
Aantal c.M <sup>3</sup> . 0,25 mol. H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> toegev. aan 100 c.M <sup>3</sup> extr. vloeist. . . . .	—	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0	3,6	6,6
Stremtijd filtraat D na 4 dagen bij 25° C. . . . .	201	164	144	105	108	105	118	192
P <sub>H</sub> . . . . .	5,27	5,18	—	—	4,86	—	4,62	4,25

Uit de cijfers blijkt, dat in iedere serie de te verwachten laagste stremtijd optreedt; de zuurgraad van het filtraat met den kortsten stremtijd ligt, in overeenstemming met hetgeen op blz. 63 vermeld is, in alle gevallen tusschen  $P_H = 4,70$  en  $P_H = 5,0$ . Ook kan nog opgemerkt worden, dat het blijkbaar onverschillig is of een kalfsmaag met melkzuur of met phosphorzuur wordt behandeld ten opzichte van de absolute hoeveelheid ferment, die wordt uitgetrokken, daar serie C en serie D gelijktijdig werd uitgevoerd met gelijke hoeveelheden van eenzelfde partij magen; de kortste stremtijden zijn dezelfde n.l. 103 sec. Het goede activeeringsgebied kan dus op de boven aangegeven wijze bepaald worden, en tevens hebben we hierin een middel om in korten tijd het enzymgehalte van magen te benaderen. Wij komen daarop nader terug. Door nu gelijktijdig 2 series extracties uit te voeren met 10 pct. NaCl-oplossingen en met 2,9 pct. NaCl-oplossingen van verschillende zuurgraad is het mogelijk op te sporen of het activeeringsgebied in hooge mate afhankelijk is van de zoutconcentratie. De uitkomsten van deze proevenseries, uitgevoerd met 2 verschillende kalfsmagen E en F, zijn in tabel V vermeld.

Tabel V.

*Invloed van de zoutconcentratie op het activeeringsgebied bij 25° C.*

Stremtijd E 10 pct. NaCl.	P <sub>H</sub>	Stremtijd E 2,9 pct. NaCl.	P <sub>H</sub>	Stremtijd F 10 pct. NaCl.	P <sub>H</sub>	Stremtijd F 2,9 pct. NaCl.	P <sub>H</sub>
204	—	234	—	191	—	181	—
152	—	230	—	161	—	172	—
144	5,04	191	—	140	—	148	—
142	4,86	145	5,08	137	—	134	—
162	4,65	151	4,84	130	4,94	126	5,01
191	—	165	4,50	128	4,84	124	4,88
242	—	170	—	131	4,76	130	4,79
—	—	—	—	139	—	137	—
—	—	—	—	150	—	140	—
—	—	—	—	235	—	145	4,29

Maagextract E wordt bij  $P_H = 4,84$  in 2,9 pct. NaCl-oplossing duidelijk aangetast; voor F is  $P_H = 4,79$  niet zonder gevaar. De uitkomsten van tabel V wijzen er op dat het activeeringsgebied voor deze extracten  $P_H = 4,70$  tot 5,0 slechts geldt in 10 pct. zoutoplossing. In minder zout bevattende milieu's wordt het gebied wat naar den alkalischen kant verschoven. Door deze proeven is niet uitgemaakt of een verplaatsing van het gebied geheel is toe te schrijven aan de zoutfout, die bij electrometrische bepalingen in 10 pct. zoutoplossingen wordt gemaakt. Behalve dat een verklaring van de oorzaak der zoutfout bij electrometrische bepalingen nog niet geheel bevredigend is <sup>1)</sup>, is het misschien ook noodig rekening te houden met den invloed van een verandering van het zoutgehalte op den toestand van het opgeloste of gesuspendeerde ferment. De functie van de waterstofionen bij de omzetting van proferment in ferment zal toch naar alle waarschijnlijkheid wel een secundaire zijn.

*Punt 3.* Het was nu nog noodig na te gaan of de stremsels bij den zuurgraad, die voor het activeeren wenschelijk is, ook nog 2 à 3 maanden zonder schade bewaard konden worden. Uit tabel I volgt al wel, dat een zuurgraad, die na 1 of 2 dagen geen gevaar oplevert, bij langere inwerking de stremkracht van de oplossing aanmerkelijk kan verminderen (b.v.  $P_H = 4,58$ . BI). Onderzocht diende te worden bij welken zuurgraad het geactiveerde ferment zonder gevaar eenige maanden bewaard kan worden. Hiertoe werden series proeven op de volgende wijze uitgevoerd. Steriele maagextracten (de extractievloeistof bevatte weer 10 pct. NaCl + 2 pct.  $H_3BO_3$ ) van verschillende herkomst werden bij  $P_H = 4,80$  (25° C.) geactiveerd. Daarna werden verschillende gedeelten van het extract met boraxoplossing gedeeltelijk geneutraliseerd. Wanneer het toevoegen van de boraxoplossing zeer voorzichtig geschiedt, behoeft het ferment niet geschaad te worden. Het is me niet mogelijk geweest de neutralisatie van een fermentoplossing met loog uit te voeren, de plaatselijke hooge alkaliteit, die onvermijdelijk even ontstaat, schijnt dadelijk schadelijk te zijn. De te bewaren maagextracten werden half December 1921 geactiveerd; met behulp van boraxoplossing werd een serie van afnemende aciditeit van ieder extract bereid en deze series eenige maanden in een thermostaat bewaard bij 25° C. De stremtijden werden zoo nu en dan bepaald en met behulp van een normaal stremselpoeder tot onderling vergelijkbare waarden omgerekend. De uitkomsten bevinden zich in tabel VI; de stremtijden zijn in seconden aangegeven. De verschillende nummers van een met dezelfde letter aangegeven extract zouden, wanneer ze niet aangetast waren, dezelfde stremtijd moeten vertoonen. Het was overbodig alle aciditeiten te bepalen; alleen de

<sup>1)</sup> Over zoutfout bij electrometrische bepalingen zie b.v. HARNED, Journ. Amer. Chem. Soc. 37, 2460 (1915) e. a.

grenzen van het stabiele gebied zijn ongeveer aangegeven. Na afloop der proef waren de oplossingen nog steriel voor het bloote oog.

Tabel VI.

*Stabiliteit van geactiveerde stremfels van verschillenden zuurgraad 25° C.*

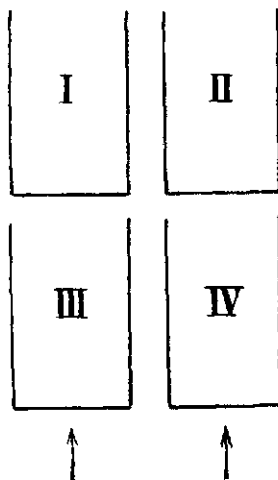
Sterkte van het Extract.	Nummer.	P <sub>H</sub>	Stremtijd.		
			3 Jan. '22.	10 Febr. '22.	17 Mrt. '22.
6400	G 1	4,80	187	206	248
	G 2	—	172	176	192
	G 3	5,37	171	169	168
	G 4	—	168	168	167
	G 5	6,06	171	170	169
4750	H 1	4,83	259	280	308
	H 2	—	240	245	294
	H 3	5,11	280	323	328
	H 4	—	231	229	228
	H 5	—	232	227	223
	H 6	—	230	227	229
	H 7	—	227	229	230
	H 8	6,18	229	229	230
5600	K 1	4,81	234	275	346
	K 2	—	211	236	225
	K 3	5,23	205	193	193
	K 4	—	193	180	191
	K 5	—	195	193	191
	K 6	—	195	196	191
	K 7	—	193	197	193
	K 8	6,38	194	197	192
8800	L 1	4,80	141	144	—
	L 2	4,98	135	131	135
	L 3	5,20	133	131	128
	L 4	—	129	130	128
	L 5	—	130	127	127
	L 6	—	131	128	127
	L 7	5,87	134	131	129

In het algemeen blijkt het goede activeeringsgebied bij langere inwerking wat schadelijk te zijn. De extracten zijn in dit opzicht echter niet alle aan elkaar gelijk. Het extract L wordt bij P<sub>H</sub> = 4,80 relatief minder beschadigd dan de andere. Toch kan uit de bovenvermelde series de gevolgtrekking worden gemaakt dat het wenschelijk is stremfels die 10 pct. NaCl als conserveermiddel bevatten bij P<sub>H</sub> = 5,3 tot 6,3 te bewaren.

Wanneer men in de practijk der stremfelbereiding met de uitkomsten van het voorafgaande onderzoek wil rekening houden zal de electrometrische bepaling der waterstofionconcentratie in veel gevallen vervangen moeten worden door de eenvoudige colorimetrische, hoewel de laatste altijd wat minder nauwkeurig is. Bij de stremfeloplossingen heeft men bovendien nog de moeilijkheid, dat door de meer of mindere mate van troebelheid, en gewoonlijk bruine kleur, de kleur van den indicator niet rechtstreeks te

vergelijken is met die welke in een waterheldere vergelijkingsvloeistof van bekende H-ionenconcentratie optreedt. Daar het ook niet mogelijk is de stremseloplossing zoo ver te verdunnen dat eigen kleur en troebelheid geen invloed meer hebben (b.v. 1 : 10) omdat de H-ionenconcentratie door verdunnen te veel verandert, is het noodig om de colorimetrische bepaling volgens de methode van WALPOLE uit te voeren <sup>1)</sup>.

Fig. II.



Zoowel het goede activeeringsgebied ( $P_H = 4,70$  tot  $5,0$  bij  $25^\circ \text{C.}$ ;  $P_H = 5,10$  tot  $5,30$  bij  $37^\circ \text{C.}$ ) als het bij langere bewaring niet schadelijke gebied ( $P_H = 5,3$  tot  $6,3$ ) kan geheel gereproduceerd worden door normaal azijnzuur in verschillende verhoudingen te mengen met normaal natronloog. De waterstof-ionenconcentraties van deze mengsels zijn door WALPOLE gemeten. Bij colorimetrische bepalingen heeft men echter ook rekening te houden met een zoutfout en daar een stremseloplossing eiwitachtige stoffen bevat misschien ook met een eiwitfout. Ik heb de kleur die de indicator

<sup>1)</sup> WALPOLE plaatst een cuvette met de gekleurde te onderzoeken vloeistof boven de vergelijkingsvloeistof waaraan de indicator is toegevoegd en vergelijkt deze combinatie met een combinatie van de te onderzoeken vloeistof + indicator en een cuvette met alleen water. Deze laatste wordt bij stremselonderzoek beter vervangen door een cuvette met een 10 pct. zoutoplossing. In bijgaande figuur II stellen I, II, III en IV de cuvetten voor met een goed vlakken bodem. In I gaat b.v. 25 c.M<sup>3</sup>. stremsel; in II 25 c.M<sup>3</sup>. stremsel + 0,1 c.M<sup>3</sup>. indicator; in III 25 c.M<sup>3</sup>. acetaatmengsel + 0,1 c.M<sup>3</sup>. indicator; in IV 25 c.M<sup>3</sup>. zoutoplossing. De belichting moet sterk en diffuus zijn, dit kan men eenvoudig bereiken met behulp van een elektrische lamp en een matglazen plaat als reflector. Door een blanco bepaling moet gecontroleerd worden, dat de beide helften gelijk verlicht zijn. Misschien is voor deze colorimetrische bepaling ook te gebruiken een z.g. „comparator” van HURWITZ, MEYER en OSTENBERG, zooals b.v. beschreven staat in CLARK, The determination of hydrogenions, p. 57.

methylrood aanneemt in de stremseloplossingen vergeleken met die in acetaatmengsels waarin ook 10 pct. NaCl was opgelost. Het bleek nu dat de oplossingen, die colorimetrisch overeenstemden, dit ook electrometrisch deden. De H-ionenconcentratie der stremseloplossingen heb ik colorimetrisch niet nauwkeuriger kunnen bepalen dan tot op 0,1 der  $P_H$ , wat voor de practische toepassing echter wel voldoende is.

De H-ionenconcentraties van eenige acetaatmengsels electrometrisch bepaald en die gemaakt zijn in 10 pct. NaCl zijn in tabel VII aangegeven.

Tabel VII.

*Aciditeit van acetaatmengsels in 10 pct. zoutoplossing bij 25° C.*

Nummer.	Aantal c.M <sup>3</sup> . N azijnz. per 100 c.M <sup>3</sup> .	Aantal c.M <sup>3</sup> . N natron- loog per 100 c.M <sup>3</sup> .	$P_H$
1	20	19,75	6,54
2	20	19,50	6,06
3	20	19,00	5,69
4	20	18,00	5,37
5	20	17,00	5,14
6	20	16,00	4,96
7	20	15,00	4,83
8	20	14,00	4,72
9	20	12,00	4,54
10	20	11,00	4,45
11	20	10,00	4,35
12	20	8,00	4,18

Dat het nuttig zal zijn bij de stremselbereiding met de boven aangegeven gebieden rekening te houden moge nog uit eenige voorbeelden blijken. Van stremselmonsters, afkomstig van verschillende fabrieken werd de zuurgraad bepaald; daarna werd met een weinig zoutzuur  $P_H = \pm 4,80$  gemaakt, terwijl de stremfels als zoodanig en die waaraan zuur was toegevoegd 4 dagen bij 25° C. werden bewaard. Bij het bepalen der stremtijden werd dan bij sommige stremfels een niet te verwaarloozen vooruitgang geconstateerd, waaruit dus besloten kan worden, dat het afgeleverde stremsel nog proferment bevatte. Gecontroleerd werd, dat deze vooruitgang niet aan het aan het stremsel toegevoegde zuur kon worden toegeschreven. Tabel VIII geeft eenige voorbeelden.

Tabel VIII.

*Toename stremkracht van handelsstremfels.*

Nummer.	$P_H$ bij aflevering.	Stremtijd zonder toevoeging.	Stremtijd + zuur 25°.	Vooruitgang in pct.
1	5,42	97	94	3,1
2	5,60	103	96	6,8
3	5,52	124	119	4,0
4	5,80	135	125	7,4
5	5,71	129	124	3,9
6	6,26	108	103	4,6

Nu is om een geheel geactiveerd stremsel te krijgen het bekend zijn met het goede activeeringsgebied wel noodzakelijk. Bij het extraheeren b.v. van verschillende partijen willekeurige kalfsmagen met een boorzuur-zoutoplossing hadden de extracten de in tabel IX vermelde aciditeit.

Tabel IX.

*Aciditeit van kalfsmaageextracten.*

Nummer.	$P_H$
A I	6,58
B II	5,79
C I	5,54
D I	5,57
E I	5,92

De zuurgraden, die de extracten vertoonen zijn aan vrij groote schommelingen onderhevig en de hoeveelheid zuur, die aan een extract moet worden toegevoegd om b.v.  $P_H = 4,90$  te bereiken zal niet altijd dezelfde zijn. A I zal heel wat meer zuur noodig hebben dan C I, al is de bufferwerking niet dezelfde. En bij een zuurgraad  $P_H = 5,5$  gaat de activeering al zoo langzaam, dat het eindpunt van vooruitgang in een gebied als 6,5—5,8 pas na maanden wordt bereikt en dan zal het nog onzeker zijn of alle proferment is omgezet. Eenige voorbeelden van zeer langzame activeering bij  $P_H = \pm 5,5$  vindt men in tabel X. In de eerste kolom is aangegeven de stremtijd, die het extract bereikt, wanneer het bij  $P_H = 4,80$  geactiveerd wordt; in de 2e kolom de stremtijd, die het na 30 à 40 dagen actvieeren bij  $P_H = \pm 5,5$  vertoonde.

Tabel X.

*Activeering bij lagen zuurgraad.*

Stremtijd geactiveerd extract bij $P_H = 4,8$ .	Stremtijd na activeering bij $P_H = 5,5$ .	Duur activeering bij $P_H = 5,5$ .
272	338	30 dagen
228	299	48 "
221	270	34 "

Een verkorting van den activeeringsduur van maanden tot een van 4 dagen maakt niet alleen de stremselbereiding minder ingewikkeld, maar zal, naar wij meenen, tevens een arbeidsbesparing opleveren.

Voor de praktijk der stremselbereiding is het dus nuttig om

rekening te houden met de volgende punten, die in verband staan met de uitkomsten van het voorafgaande onderzoek.

1. Duur van de extractie.
2. Waardebepaling van kalfsmagen.
3. Activeering der stremseoplossingen.
4. Zuurgraad van af te leveren stremfels.

*Punt 1. Duur van de extractie.*

In het algemeen ziet men, wanneer men de kalfsmagen lang met de extractievloeistof in aanraking laat, dat de stremkracht van deze laatste toeneemt. Ik meen echter deze toename grootendeels aan een activeering van het al geëxtraheerde proferment te mogen toeschrijven en acht het niet noodig, dat een partij magen langer dan 24 uur met dezelfde extractievloeistof in aanraking is. Dit blijkt nog uit het volgende voorbeeld. Een bepaalde gewichtshoeveelheid maag werd geëxtraheerd met een boorzuur-zoutoplossing en na 1 dag afgefiltreerd. De stremtijd van het filtraat was 280 sec. Dezelfde hoeveelheid werd 4 dagen bij 25° C. geëxtraheerd met een aangezuurde boorzuur-zoutoplossing zoodat  $P_H = 4,80$  was. Dit tweede filtraat had een stremtijd van 105 sec. Het eerste filtraat, van de 24-urige extractie had echter, na activeering, ook een stremtijd van 104 sec.; zoodat door een verlenging van den extractieduur van 1 tot 4 dagen geen meerdere opbrengst wordt verkregen. Ik heb dit ook nog aan een andere partij magen kunnen constateeren. Langere extractieduur geeft schijnbaar een grootere opbrengst, die echter na activeering niet meer bestaat; de extracten vertoonen dan gelijke stremtijden.

*Punt 2. Waardebepaling van kalfsmagen.*

Wanneer men gelijke hoeveelheden kalfsmaag extraheert met gelijke hoeveelheden extractievloeistof van toenemende aciditeit gedurende 4 dagen bij 25° C., vertoonen de stremtijden der filtraten een minimum, de stremkracht van één der filtraten dus een maximum. In dat filtraat is geen proferment meer aanwezig. De stremkracht van het filtraat met minimum stremtijd is, in verband met het aantal per gram maag toegevoegde c.M<sup>3</sup>. extractievloeistof, een maat voor de hoeveelheid verkrijgbaar ferment. Een vergelijking van de hoeveelheid ferment uit 1 gram van een partij magen, berekend uit den laagsten stremtijd van een serie als boven beschreven proeven (methode I) met de hoeveelheid verkregen door een monster van dezelfde partij magen tot uitputting te extraheeren en het verkregen extract bij den goeden zuurgraad te activeeren (methode II) is in tabel XI voor eenige zeer veel in fermentgehalte verschillende maagmonsters aangegeven. Ik wil er hier nog eens op wijzen, dat het noodig is bij deze berekeningen uit te gaan van stremtijden die niet lager zijn dan tenminste 4 minuten, daar anders de afwijkingen van de tijdwet een te groote rol gaan spelen.

Tabel XI.

*Waardebepaling van kalfsmagen.*

Nummer.	Methode I.	Methode II.	Afwijking in pct.
A	3840	4200	8,6
B	11700	11900	1,7
C	2000	2150	7,0

Een verschil in uitkomst der beide methoden is op grond van de adsorbtie, die bij methode I een grootere rol speelt en waardoor de uitkomsten volgens deze methode verkregen lager zullen zijn, te verwachten. Dat deze adsorbtie in een zeer sterke oplossing, zooals B, relatief minder is dan in de minder sterke oplossingen A en C is niet met de theorie in strijd. De zuurgraad van de extractievloeistof waarmee de waardebepaling volgens methode II wordt uitgevoerd heeft geen invloed op de hoeveelheid totaal verkrijgbaar ferment. Extractie met vloeistoffen van verschillende zuurgraad geeft een verschil in stremtijd, dat door activeering wordt opgeheven. Wanneer dus een kalfsmaag bij extraheeren geen ferment meer aan de oplossing afstaat, is er ook geen proferment meer te extraheeren. Methode I geeft zonder bepaling der H-ionenconcentratie op betrekkelijk eenvoudige wijze een inzicht in het totaal fermentgehalte van magen; de uitkomst zal altijd eenige procenten te laag zijn. Wanneer van groote partijen kalfsmagen een dergelijke waardebepaling moet worden verricht hangt het in hooge mate af van de mogelijkheid van een goed homogeen monster te verkrijgen of deze waardebepaling een bruikbare uitkomst zal geven voor de hoeveelheid ferment, die door de bereiding moet worden geleverd. Proeven hier op betrekking hebbende zouden nog moeten worden uitgevoerd.

*Punt 3. Activeering der stremseloplossingen.*

Om de activeering der kalfsmaagextracten zonder beschadiging in eenige dagen te doen aflopen moeten deze extracten gedurende dien tijd aan een zuurgraad zijn onderworpen, die afhankelijk is van de te gebruiken temperatuur. Men kan dit nu in het algemeen op twee wijzen bereiken:

- A. De magen worden uitgetrokken met een zoodanig aangezuurde extractievloeistof, dat na afloop der extractie de gewenschte zuurgraad is bereikt.
- B. De magen worden uitgetrokken met een boorzuur-zoutoplossing zonder zuurtoevoeging en met behulp van een colorimetrische bepaling wordt bepaald hoeveel zuur men aan het verkregen extract moet toevoegen om het gewenschte activeeringsgebied te bereiken.



Wanneer men volgens A te werk gaat bepaalt men dus op dezelfde wijze als bij de waardebepaling welke extractievloeistof met een monster der te extraheeren magen na 4 dagen de kortste stremtijd vertoont en gebruikt deze vloeistof voor de geheele partij. De waardebepaling ligt dan in deze werkwijze opgesloten.

Volgens B werkende moet het verkregen extract, wil men b.v. bij 25° C. activeeren op  $P_H = 4,80$  gebracht worden. De kleur met methylrood moet dus ongeveer overeenstemmen met acetaatmengsel No. 7 (tabel VII). Men kan nu uitgaan van b.v. 25 c.M<sup>3</sup>. stremsel en hieraan zooveel van een 3,5 procentige zoutzuuroplossing toevoegen tot de gewenschte tint bereikt is, waarbij van een in  $\frac{1}{50}$  c.M<sup>3</sup>. verdedeld pipetje gebruik gemaakt kan worden. Door toevoegen van het zuur ontstaat gewoonlijk een troebeling in het stremsel, die na eenige minuten weer verdwijnt. Een niet of zeer langzaam verdwijnen van de troebeling is lastig bij de colorimetrische bepaling. Men kan dan ook wel door een grof soort filtreerpapier filtereeren. Door eenvoudige berekening is dus dan de hoeveelheid zuur te bepalen die aan de totale hoeveelheid extract moet worden toegevoegd.

Ik heb hier in beide gevallen ondersteld, dat extracties van magen met boorzuur-zoutoplossingen altijd een extract leveren waarvan  $P_H > 4,80$ . Het is echter in de practijk blijkbaar wel voorgekomen, dat magen een zoo zuur extract geven dat het schadelijk was. In dit geval zal men werkende volgens methode A geen kortsten stremtijd vinden, die van het minst zure extract zal de kortste zijn. Men moet dan echter den zuurgraad van dit extract electrometrisch of colorimetrisch controleeren. Volgt men methode B dan blijkt een te zure reactie direct bij de colorimetrische bepaling en ze kan dan met boraxoplossing voorzichtig worden afgestompt.

#### *Punt 4. Zuurgraad van af te leveren stremfels.*

Deze zuurgraad is aan een niet zoo klein gebied gebonden als die van het goede activeeringsgebied bij een bepaalde temperatuur. De zuurgraad van een stremsel, dat bewaard moet worden behoort tusschen  $P_H = 5,3$  en 6,3 te liggen. De begrenzing naar den alkalischen kant is met behulp van rosolzuur (door VAN DAM <sup>1)</sup> gegeven. Ook broomthymolblauw is hiervoor wel bruikbaar. Deze indicator, aan een onverdund stremsel toegevoegd, moet geheel zijn zure tint vertoonen d.i. geel. De begrenzing naar den zuren kant is met behulp van methylrood uit te voeren. Bij aflevering mag een stremsel niet een meer zure kleur aanwijzen met dezen indicator dan acetaatmengsel No. 4 (tabel VII). Verdunt men een stremsel 1 : 10 dan kan het voorkomen dat de  $P_H$  eenige eenheden in de 1e decimaal naar den alkalischen kant verandert. Het is daarom vooral bij het afgrenzen naar den zuren

<sup>1)</sup> VAN DAM loc. cit. blz. 62.

kant aan te raden een stremsel niet te verdunnen voor de colorimetrische bepaling. Het verdient misschien aanbeveling bij het onderzoek van handelsstremfels aan de contrôlestations ook de kleurbepaling met methylrood toe te passen, maar dan zou ook het zoutgehalte bepaald moeten worden, en bij afwijkingen van ongeveer 10 pct. NaCl met den invloed hiervan op de aanwijzing van den indicator rekening te houden zijn. Om dezen invloed te bepalen zou nog een afzonderlijk onderzoek noodig zijn.

Op ons verzoek stelde de directeur der Coöperatieve Stremfel-fabriek in Leeuwarden ons in de gelegenheid de hierboven vermelde uitkomsten in praktijk te brengen, waarvoor wij bij dezen gaarne onzen dank betuigen. Hierbij is gebleken, dat op zeer eenvoudige wijze in de fabriek met het hierboven vermelde rekening kan worden gehouden, en dat dus inderdaad de aflevering van geheel geactiveerd stremfel binnen veel korteren tijd mogelijk is, waardoor o.a. ook aanmerkelijk aan ruimte wordt gewonnen in het bedrijf.

Het achteruitgaan van handelsstremfels wordt soms veroorzaakt door schimmels. Het voorafgaande onderzoek geeft uiteraard geen inzicht in de meest gunstige voorwaarden voor schimmelgroei. Wel is herhaaldelijk geconstateerd kunnen worden, dat de reactie van sterk schimmelende stremfels, waarvan de stremkracht was afgenomen duidelijk alkalisch was geworden op broomthymolblauw. En dan is, wat betreft de schimmelgroei, nog het volgende geconstateerd:

Handelsstremfels van verschillende herkomst werden door middel van kaarsfiltratie gesteriliseerd, op verschillenden zuurgraad gebracht (van  $P_H = \pm 5,3$  tot  $P_H = \pm 6,6$ ) en daarna geënt met een bepaalde hoeveelheid niet gesteriliseerd extract. Na eenige dagen in den thermostaat bij  $25^\circ C.$  bewaard geweest te zijn werd waargenomen in welke vloeistof de schimmel het eerst optrad. In alle gevallen bleek, dat de schimmel bij een bepaalden zuurgraad het eerst en in de grootste hoeveelheid aanwezig was, terwijl dan zoowel naar den zuren als den minder zuren kant de groei weer afnam. Echter was er geen regelmaat te constateeren van een bepaald optimaal gebied voor alle schimmels, wat ook niet verwacht kan worden. Bij een gedeelte van de handelsstremfels was een meer zure reactie gunstig voor die bepaalde schimmel; bij een ander gedeelte een meer naar den minder zuren kant gelegen reactie.

Uit deze proeven, die met 8 verschillende handelsstremfels zijn uitgevoerd kan alleen de conclusie getrokken worden, dat er niet voor ieder willekeurig stremfel een zuurgraad geschikt voor bewaring kan worden aangegeven, waarbij de kans op schimmelvorming minimaal is. Een meer uitgebreid onderzoek, dat echter buiten het kader van dit artikel valt, zal hiervoor noodig zijn.

### Rationelle Bereitung und Aufbewahrung von Labextracten.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Die vorliegende Untersuchung befasst sich mit der Geschwindigkeit der Activierung der profermenthaltigen Lablösungen in Zusammenhang mit der reellen Acidität, sowie mit den Stabilitätsbedingungen der fertigen Lablösungen. Es wurden Fermentlösungen verwendet, die den in der Praxis üblichen, möglichst gleich waren und 10 pct. NaCl mit oder ohne Zusatz von 2 pct.  $H_3BO_3$  als Konservierungsmittel enthielten. Es zeigte sich dass die Umwandlung des Proferments ohne Schädigung desselben mit geeigneter Geschwindigkeit nur in einem Gebiete bestimmter Acidität vor sich geht. Letzteres wurde bei  $25^\circ C.$  zu  $P_H = 4,7$  bis  $5,0$ ; bei  $37^\circ C.$  zu  $P_H = 5,1$  bis  $5,3$  gefunden. Das Gebiet wurde von der Art der verwendeten Säure nicht beeinflusst. Es wurde darauf hingewiesen, dass die electrometrischen  $P_H$  Messungen dieser Flüssigkeiten einem Salzfehler ausgesetzt sind; die gefundenen Zahlen sind also nicht als absolute zu betrachten. Die geeignete Aktivierungsacidität schadet dem Ferment etwas bei längerer Einwirkungsdauer. Es ist daher zu empfehlen derartige Lablösungen bei  $P_H = 5,3$  bis  $6,3$  auf zu bewahren.

Es wurde angegeben wie die Praxis der Käselabbereitung mittels colorimetrischen Bestimmungen mit Methylrot den geeigneten Gebieten reeller Acidität Rechnung tragen kann und zwar so dass es möglich ist innerhalb einiger Tage ganz activierte und beständige Lablösungen zu erhalten. Es wurde weiter gezeigt wie das zur Ablieferung geeignete Gebiet mittels Indicatoren innegehalten werden kann.

Die Anwesenheit mehr oder weniger bedeutender Mengen Proferment konnte in sechs verschiedenen Handelslabextracten dargetan werden, was auf eine irrationelle Bereitungsweise derselben hinwies.

Es wurde noch festgestellt dass die Extraktionsdauer 24 Stunden nicht zu überschreiten braucht; und schliesslich wurde eine Methode für die Wertbestimmung von Handelsmagen angegeben.

