

## RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION GRONINGEN.

---

### De bacteriologische bereiding van meel uit aardappelpulp,

DOOR

Dr. F. C. GERRETSEN. <sup>1)</sup>

(Ingezonden 7 Februari 1930).

---

### INLEIDING.

Bij de mechanische bewerking die de aardappels ondergaan om het zetmeel er uit te krijgen, blijkt dat het niet mogelijk is om alle cellen open te maken. Dit heeft ten gevolge, dat de overblijvende vezelmassa nog vrij groote hoeveelheden zetmeel bevat, varieerende van 50—60 % berekend op droge pulp en ongeveer 11,5 % van het totale in de aardappels aanwezige meel.

Men laat deze pulp gedurende eenige maanden, soms zelfs wel een jaar in groote putten, de zgn. vezelgaten aan zichzelf over, waarbij voornamelijk door bacteriënwerking nog een gedeelte van het zetmeel wordt vrijgemaakt.

Dit meel wordt in de vezelcampagne gewonnen, waarna een pulp overblijft die nog vrij wat zetmeel bevat, varieerend van 30—52 %, gemiddeld ongeveer 36—40 %, wat overeenkomt met 6 à 7 % van het oorspronkelijk aanwezige meel. Per jaar wordt globaal van deze pulp een 100 000 ton geproduceerd met een vaste stofgehalte van 12½ %, welke pulp als veevoeder wordt verkocht tegen een prijs, die ver beneden de waarde is van het in die pulp aanwezige zetmeel.

De vraag die bij het Rijkslandbouwproefstation werd ingediend was of het niet mogelijk was het meel uit de pulp langs bacteriologischen weg te winnen.

Door SAARE <sup>2)</sup> zijn in deze richting al eens proeven genomen door aardappelschijven met slijk uit een vijver te enten; onder afsluiting van de lucht zou al het meel kunnen worden vrijgemaakt, zonder dat het zetmeel werd aangetast. Er werd echter een zoo onaangename rottingslucht geproduceerd, dat hierdoor de toepassing van het proces bezwaarlijk zou zijn. Kalktoevoeging kon dit euvel slechts gedeeltelijk bestrijden. De mogelijkheid om het

---

1) Hierbij zij vermeld, dat de heer J. Schouw, door de Ver. v. Coöp. Aardappelmeeifabrik. welwillend ter beschikking gesteld, mij bij de analyses zeer actief ter zijde heeft gestaan.

2) Die Fabrikation der Karroffelstärke, blz. 871.

2100659

meel langs bacteriologischen weg te winnen is gegeven door het feit, dat er bacteriën zijn die wel de cellulose aantasten, doch niet het zetmeel.

KELLERMAN en MC. BETH<sup>1)</sup> hebben o.a. een cellulosebacterie gevonden, die wel cellulose doch geen zetmeel als koolstofbron kon gebruiken; dat er meerdere organismen zouden zijn, die wel cellulase doch geen diastase produceeren is zeker niet uitgesloten, hoewel het uit een zuiver chemisch oogpunt niet voor de hand ligt, dat de moeilijk aantastbare cellulose eerder zou worden omgezet dan het gemakkelijk te ontleden zetmeel.

Voor de aantasting van de pulp staan twee hoofdwegen open, de anaerobe, die meestal langzaam verloopt met kans op onaangenaam riekende rottingsgassen en de acrobe, waarbij de celwandstof door de microorganismen in korten tijd tot koolzuur en water wordt geoxydeerd.

Enkele voorloopige proeven met anaerobe-omzettingen gaven veel minder hoopvolle resultaten dan die, waarbij uitgegaan werd van goed werkzame aerobe cellulosebacteriën. Deze laatsten bleken in staat de celwanden binnen 24 uur af te breken en het grootste gedeelte van het meel in vrijheid te zetten.

Daar hierbij ook geen onaangename gassen geproduceerd werden, leek het wenschelijk de mogelijkheden en de voorwaarden voor dit proces nader te onderzoeken.

### *Methodiek.*

#### *Reincultuur der cellulose bacteriën.*

Voor de isolatie van snel werkende cellulose bacteriën bleek, dat deze vooral in paardemest veelvuldig voorkwamen, terwijl koeien-, schapen- en varkensmest minder vaak intensief werkende cultures leverden. In een erlemeijer van 500 cc. werd een schijf filtreerpapier gedaan en 100 cc. van een voedingsoplossing, welke bevatte 0,1 %  $K_2HPO_4$ , 0,05 %  $MgSO_4$  en 0,1 %  $(NH_4)_2SO_4$ , waarna met een weinig mest geënt werd. Zoodra het papier teekenen van aantasting vertoonde werd de vloeistof afgegoten, het papier voorzichtig afgespoeld en een klein stukje van het sterkst aangetaste gedeelte in een nieuwe kolf gedaan.

Voor het verkrijgen van reincultures werd afgestreken op cellulose agar, welke naast cellulose de bovengenoemde voedingsvloeistof bevatte. Bij de bereiding van de cellulose werd gebruik gemaakt van het door VON WEIMARN<sup>2)</sup> geconstateerde feit, dat cellulose oplost in geconcentreerde oplossingen van bepaalde zouten, o.a.  $CaBr_2$ .

Voor ons doel het meest geschikt bleek de volgende werkwijze: aan 28 cc. water voegt men 50 gr.  $CaBr_2$  toe en 0,5 gr. verbandwatten. Men verwarmt langzaam tot 70 à 75° C. en voegt dan nog 15 gr.  $CaBr_2$  toe, waarna men het geheel zoo lang op 75° C. houdt, tot de watten juist zijn opgelost en niet meer draderig aan elkaar hangen. Men krijgt dan een dik vloeibare massa, die men voorzichtig en onder voortdurend omroeren uitgiet in ongeveer  $\frac{1}{2}$  liter water. De cellulose slaat neer, men laat bezinken, schenkt de boven-

1) Centr. Blatt. f. Bakt. IIe Abt. Bd. 34. Blz. 14.

2) Kolloid Zeitschr. 29, blz. 198 en 36, blz. 338.

staande vloeistof af of eventueel centrifugeert men. Daarna laat men het precipitaat in een hoog bekglas of diffusie-apparaat uitloogen door een kalme waterstroom in te leiden. De volgende morgen is de broomreactie meestal reeds verdwenen; de afgecentrifugeerde moederloog kan men opnieuw gebruiken na filtreren en indampen.

Bij deze bereiding moet men vooral niet te hoog of te lang verhitten, daar dan de cellulose te ver gehydrolyseerd wordt en als een gelatineuze massa precipiteert. Bij te korte verhitting zijn de vezels niet voldoende uit elkaar gevallen. Bij een goed bereid preparaat ziet men onder het microscoop duidelijk dat de vezels grootendeels uit elkaar gevallen zijn, zoodat ze zich, nog vochtig, goed met de agar laten mengen. Bij de afstrijking van een sterk werkende cellulosecultuur krijgt men op een dergelijke cellulose agar binnen 14 dagen verschillende koloniën, waarvan enkele een oplossingsveldje beginnen te vertoonen, wat echter eerst na een maand heel duidelijk is. Bij beschouwing van nevengaande foto's (fig. I), waarbij de cellulose rond en onder de kolonie geheel tot oplossing is gebracht, kan er geen twijfel meer bestaan of de bacteriën hebben een *oplosbaar* diffundeerend enzym *afgescheiden*.

De koloniën, welke het best de cellulose aantastten, werden geïsoleerd en daarna in een kolf met papierschijf gebracht. Nadat deze uiteen gevallen was werd de inhoud overgebracht in een erlemeyer van 2 liter, waarin 1500 cc. cultuurvloeistof en 5 gram filtreerpapier in kleine stukjes geknipt. Deze erlemeijer werd van een gummikurk met doorluchtbuis en afvoerbuis voorzien, omgedraaid en bij 80 gr. door watten gefiltreerde lucht doorgeblazen. Op deze wijze verdwijnt het papier binnen enkele dagen en krijgt men buitengewoon intensief werkende cultures.

De aldus verkregen cultures werden gebruikt voor de enting van de aardappelpulp.

#### *De pulp.*

Met behulp van een laboratoriummolen werden de aardappels, welke zorgvuldig waren schoongemaakt en gedurende eenige minuten in kookend water waren gedompeld ter vernietiging van eventueel aanwezige protozoen, geraspt. Het fijn gemalen product werd met water door een grove zeef met mazen van  $\frac{1}{2}$  mm gespoeld, waarbij de onvoldoend verkleinde stukken achterbleven, doch het meel en de fijne pulp doorheen ging.

Dit werd gebracht op een zeef voorzien van zijdegaas nr. 14 (0,11 mm diam.), waar het meel doorheen ging en de pulp op achter bleef.

De aldus bereide pulp werd tusschen twee plankjes in een pers uitgeperst tot het vaste stofgehalte ongeveer 45 % bedroeg. In een aantal gevallen werd deze pulp partieel gesteriliseerd door er gedurende eenige weken chloroform op te laten inwerken. Vóór het gebruik werd dan een bepaalde hoeveelheid in water gesuspendeerd en hierdoor zoo lang steriele lucht geblazen totdat de bekende chloorreactie met een gloeiend kopergaasje niet meer optrad.

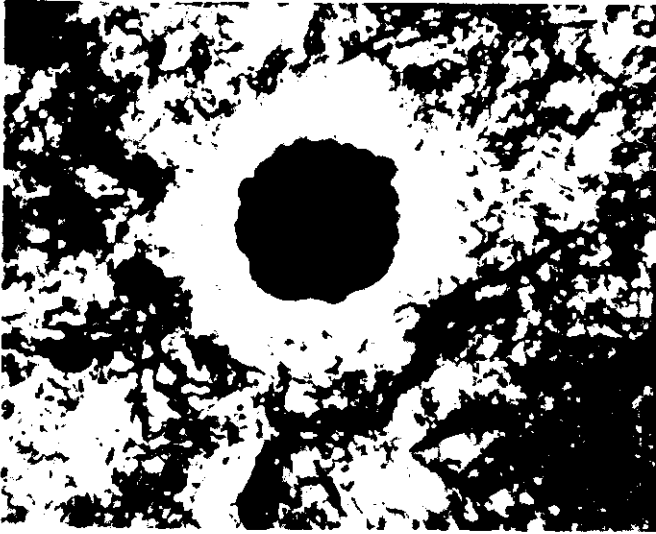


Fig. I. Aanzicht en verticale doorsnede van een kolonie eener cellulose bacterie, op cellulose agar.  
De heldere zône rond en onder de kolonie wordt veroorzaakt door de afscheiding van een oplosbaar enzym, dat de papiervezels binnen het halve bolvormige diffusieveld heeft opgelost.

Op deze wijze werd wel geen volkomen steriliteit bereikt, doch wel het grootste aantal in de pulp aanwezige kiemen gedood, terwijl de pulp daarbij zoo goed als onveranderd bleef. Een poging om voor dit doel broomdamp te gebruiken had geen succes.

Daarnaast werd ook gebruik gemaakt van fabriekspulp, zoowel versche pulp direct van de eerste zetmeelwinning als die, welke overblijft na de zgn. vezelcampagne.

#### *De aerobe ontsluiting van de cellen.*

De snelheid waarmee in geëtereerde cultures de cellulose door cellulose bacteriën tot verdwijnen wordt gebracht deed veronderstellen, dat langs dezen weg de pulp in korten tijd ontsloten zou kunnen worden.

De proef werd als volgt ingericht: in een erlemeyer van twee liter werd 1500 cc. cultuurvloeistof gedaan, welke bevatte 0,1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en 0,1 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Hierin werd gebracht ongeveer 40 gram pulp met een vaste stofgehalte van 45 %, (watergehalte en zetmeelgehalte werden zorgvuldig bepaald). Geënt werd met 50 cc. van een goed werkende cellulose cultuur. De erlemeyer werd voorzien van een gummikurk, waarin twee buizen, één voor de luchtinvoer en één voor de uitlaat.

De erlemeyer werd onderste boven gezet en de inlaatbuis en luchttoevoer zoo geregeld, dat de vezels voortdurend in beweging bleven en zich niet op den bodem vast zetten.

Aanvankelijk schuimde de vloeistof dermate, dat verliezen optraden; een poging om dit te voorkomen, door een weinig olie op de vloeistof te laten drijven, mislukte, doordat er een emulsie ontstond en de bacteriën veel minder snel werkten.

Door de pulp aanvankelijk met meer water schoon te spoelen, waardoor de eiwitten geheel verwijderd werden, kon het overschuimen worden tegengegaan.

De duur van de proef was afhankelijk van de snelheid waarmee de bacteriën de pulp omzetten en varieerde van 18 uur tot enkele dagen. De temperatuur, waarbij de omzetting tot stand gebracht werd, bedroeg 28° C.

#### *Het winnen van het meel.*

Nadat de bacteriën de celwanden hadden opgelost werd de cultuur afgebroken en geanalyseerd. De bepaling van het meel en het residu geschiedde door de vloeistof over een zeef met mazen van  $\frac{1}{2}$  mm diam. te zeven. Hierop bleven de grofste onaangetaste vezels achter, wat meestal zeer weinig was. Daarop werd het filtraat door filterdoek 14 nogmaals gezeefd en met een sterke waterstraal zooveel mogelijk van het residu er doorheen gespoten. Het overblijvende, bestaande uit ongeopende cellen en stukjes schil werd bij het eerste residu gevoegd, gedroogd en gewogen. Het filtraat werd in een ondiepe porceleinen schaal opgevangen en ongeveer een half uur ter bezinking weggezet. Na afschikking van de bovenstaande vloeistof werd het overblijvende meel aanvankelijk eenmaal met water gewasschen, gefiltreerd,

met alcohol gewasschen, voorzichtig gedroogd, eerst aan de lucht en later op 105° C.

Het op deze wijze verkregen meel was in sommige gevallen vrij zuiver, doch bevatte somtijds nog bacteriën materiaal, kleine stukjes van celwand of epidermis e.d.

Door het betrekkelijk hooge soortelijk gewicht van de zetmeelkorrels bestond de mogelijkheid, dat in een vloeistof met een bepaald soortelijk gewicht de zetmeelkorrels nog juist zouden zinken en de verontreinigingen blijven drijven. Tot zekere hoogte lukte dit met een mengsel van 71 % tetra-chloorkoolstof en 29 % alcohol, vooral wanneer de zetmeelkorrels door toevoeging van wat jodium verzwaard waren geworden en afgecentrifugeerd werden. In die gevallen, waarin de zetmeelkorrels door bacteriën waren omgeven, lukte ook deze methode niet.

Het beste voldeed ten slotte de volgende methode.

Na zeven door zeefdoek N<sup>o</sup>. 14 werd het meel gedurende een half uur ter bezinking weggezet, daarna het bovenstaande water afgegoten en met een nieuwe hoeveelheid water opgeschud. Daarna kwam het in de draaiende slijbmolen van nevengaande afbeelding fig. 2 en 3.

In een glazen schaal, diam. 24 cm, was in het midden een gat geboord van ongeveer 2 cm diam., tegen den onderkant van de schaal was een koperen plaat bevestigd met behulp van „de Kotinsky” cement, de daaraan bevestigde spil was gedeeltelijk hol en van een zijgat voorzien, zoodanig, dat het meel gemakkelijk naar het gootje kon loopen. De bodem van de schaal werd nu onder een hoek gezet en de schaal werd met het meelhoudend water juist zoover gevuld, dat de meniscus even beneden het gat in het centrum stond. Het meel in de bak bezinkt snel en wordt dan door de draaiing van de schaal uit het water naar boven gedraaid. De schaal wordt in beweging gebracht door middel van een hefboompje, dat door een electromotortje wordt heen en weer bewogen en voorzien is van een rubber kurk, die tegen de zijkant van de schaal duwt en deze periodiek een klein eindje verder duwt, tegelijkertijd aan de schaal een schommelende beweging gevend.

Deze schommelende beweging zorgt er voor, dat de lichtere verontreinigingen, die tusschen de bezonken zetmeelkorrels liggen, juist op de scheiding tusschen lucht en water er tusschen uit worden gespoeld.

Het meel, bevrijd van verontreinigingen, wordt nog iets verder naar boven gedraaid en komt tegen een rubberlap, die schuin op de draaiingsrichting van de schaal staat en waardoor het meel naar het centrum wordt gedreven om ten slotte door het gaatje in het midden naar de goot af te vloeien. In de meeste gevallen is het meel na éénmaal door dit apparaat gegaan te zijn voldoende gereinigd om gedroogd te worden, terwijl nagenoeg al het meel binnen 5 à 10 minuten uit het water wordt afgescheiden. Dit is een gevolg van het feit, dat de vloeistoflaag in de schaal slechts enkele centimeters dik is en zeer snel afneemt naarmate de meniscus genaderd wordt en het dus zeer vlug kan bezinken.

Wanneer het meel slecht bezinkt en door bacteriën massa's omgeven is, is het het best eerst een weinig chloorwater toe te voegen, waardoor de verontreinigingen binnen enkele minuten loslaten en gedeeltelijk geoxydeerd

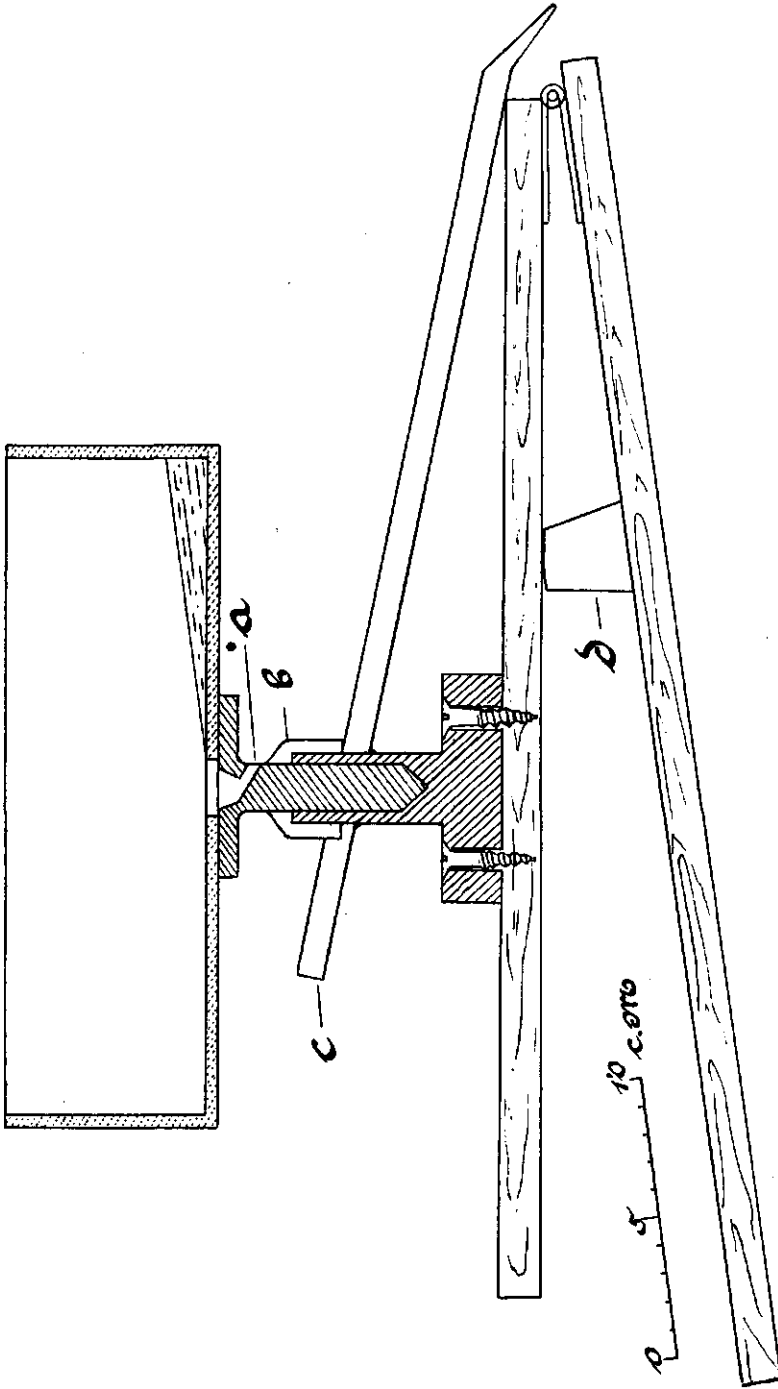


Fig. II. Slibmoleentje voor het afscheiden van meel uit suspensies.  
*a.* gat in de as waardoor het afgescheiden meel naar de goot *c* loopt;  
*b.* aan de as verbonden kapje, hetwelk voorkomt dat meel langs as wegloopt;  
*d.* gummi kurk waardoor het geheel eenigszins veerend kan worden opgesteld.

worden, terwijl het meel mooi wit van kleur nu gemakkelijk door het molentje er uit te draaien is.

Het gebruik van chloor wordt ook door SAARE <sup>1)</sup> aanbevolen in die gevallen, waar het meel moeilijk afzet of verontreinigd is door bacteriën materiaal.

#### *De resultaten.*

Bij de eerste proef, die op bovenbeschreven wijze was aangezet, werd uit 25 gr. vezels met een vaste stofgehalte van 11,25 gr. 4,46 gr. droog meel verkregen. Dit was dermate hoopvol, dat een tweede proef werd ingezet, waarbij geënt werd met 250 cc. van de eerste vloeistof. Reeds na 24 uur waren de vezels grootendeels verdwenen en bij de analyse bleek, dat uit 25 gr. vezels met een vaste stofgehalte van 11,25 gr. niet minder dan 7,06 gr. meel gevormd was, terwijl het residu 1,23 gr. bedroeg. Het totale meelgehalte van deze vezels bedroeg 66,9 %, gerekend van de droge stof, zoodat op deze wijze 94 % van het aanwezige zetmeel gewonnen werd.

De eerste vraag was nu in hoeverre men deze proeven onafgebroken zou kunnen herhalen.

Daar het in de practijk toch niet mogelijk zou zijn, om de cultures steriel te houden, werd geprobeerd of wellicht ook de ruwcultures van cellulose bacteriën even goede resultaten zouden opleveren. Deze ruwcultures werden verkregen door de paardemestcultuur herhaaldelijk over te enten en wanneer ten slotte het papier sterk was aangetast eenige cc. van de goed omgeschudde cultuur te brengen in een omgekeerde erlemeyer van 2 L, waarin 5 gr. papier en 1500 cc. der genoemde cultuurvloeistof.

De erlemeyer werd onafgebroken geaereerd en wanneer na ongeveer 8 dagen het papier grootendeels verdwenen was, werd nogmaals een hoeveelheid papier toegevoegd. Na 4 dagen kan dit reeds zeer sterk aangetast zijn en voor de enting der pulpsuspensies worden gebruikt. Men kan eventueel nog eerst een maal overenten in een nieuwe cellulosesuspensie ten einde een nog krachtiger cultuur te krijgen; nadat het eerst toegevoegde papier verdwenen is, wat soms reeds na twee dagen het geval kan zijn, voegt men nog eenige grammen papier toe en gebruikt deze cultuur voor de enting zoodra dit papier grootendeels verdwenen is. Men moet echter niet de cultuur, nadat het papier vrijwel opgelost is, eenige dagen laten staan, daar dan andere bacteriën naar voren komen. 25 Gram aardappelvezels gesuspendeerd in 750 tot 1000 cc. cultuurvloeistof worden nu met 250 cc. van de cellulosecultuur geënt.

Om een behoorlijke omzetting te krijgen, is het wenschelijk de eerste cultuur wat langer te staan, bijv. 48 uur. Het meel werd van het residu gescheiden en 250 cc. van de vloeistof gebruikt voor de volgende cultuur. Deze behoefde slechts 22 uur geaereerd te worden, evenals de daarop volgende overentingen, om zoo goed als alle vezels te ontsluiten.

In de volgende tabel vindt men de resultaten van 16 achtereenvolgende overentingen, alle afstammend van de hierboven beschreven ruwcultuur van cellulose bacteriën. (25 gr. pulp bevatte 10,9 gr. vaste stof en 7,29 gr. zetmeel.)

1) Die Fabrikation der Kartoffelstärke, 1897, blz. 243.



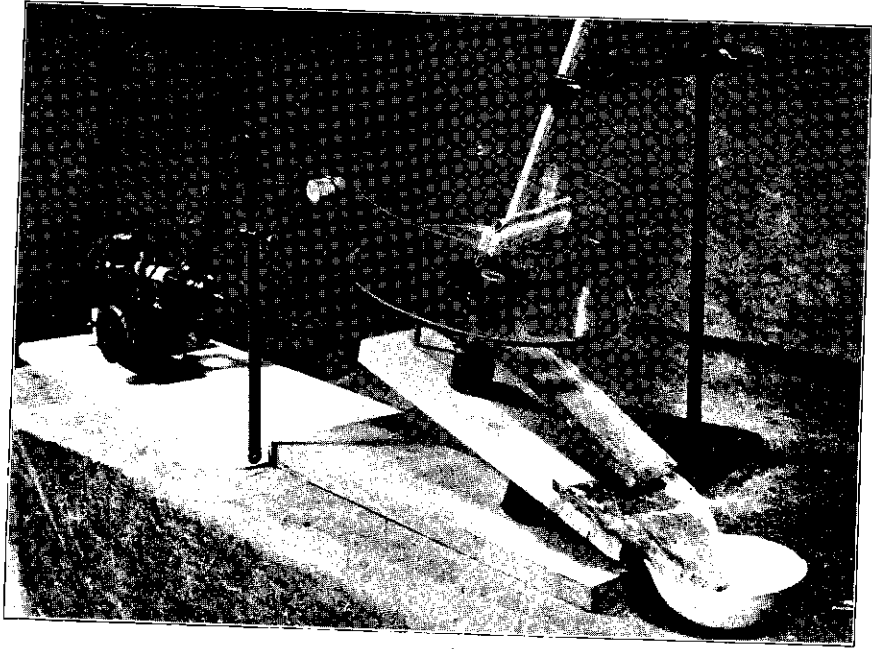


Fig. III. Slibmolentje aangedreven door een electrisch motortje met ver-  
tragings mechanisme. Door de heen en weer gaande veer met gummiark  
krijgt het geheel een draaiende en tevens schuddende beweging, noodig  
voor het achterlaten der verontreinigingen.



TABEL I.

Overenting N <sup>o</sup> .	Meel gram.	% meel vrij-gemaakt.	Vezel-residu gram.	Vezel-residu in % van de oorspr. stof.	% meel verloren.	Door bact. opgelost %.
1. (48 u.). . . . .	7.10	97.5	1.20	11.0	0.0	23.9
2. (22 u.). . . . .	5.68	78.0	1.96	18.0	10.7	29.9
3. (22 u.). . . . .	5.76	79.1	1.78	16.3	11.4	30.8
4. idem . . . . .	5.69	78.0	1.98	19.2	10.3	29.6
5. . . . .	6.34	87.0	1.29	11.2	8.2	30.0
6. . . . .	6.20	85.1	1.66	15.2	5.6	28.8
7. . . . .	6.93	95.1	1.26	11.5	0.4	24.9
8. . . . .	6.86	94.1	1.10	10.1	2.7	27.0
9. . . . .	7.30	100.0	0.77	7.1	0.0	26.0
10. . . . .	7.18	98.6	0.70	6.7	1.5	27.5
11. . . . .	6.89	94.5	0.83	7.6	3.3	29.2
12. . . . .	6.52	89.6	1.16	10.6	7.1	29.5
13. . . . .	6.60	90.6	1.02	9.4	7.3	30.1
14. . . . .	6.69	91.7	0.78	7.2	8.2	31.5
15. . . . .	6.74	93.3	1.54	14.1	0.5	24.0
16. . . . .	6.91	94.9	1.47	13.1	0.0	23.1
Gemiddeld . . . . .	6.59	90.4	1.26	11.7	4.9	27.9

Bij deze tabel wordt het volgende opgemerkt :

Meel en vezelresidu zijn bepaald na droging bij 105° C. De door de bacteriën opgeloste hoeveelheid materiaal bevat zoowel het ontweken koolzuur als de in oplossing gebrachte stoffen en werd eenvoudig berekend door de terug gevonden hoeveelheden meel en residu van het oorspronkelijke droge stofgehalte af te trekken.

Om het proces te kunnen beoordeelen is ook noodig om te weten hoeveel meel door de bacteriën ontleed is geworden; dit wordt bemoeilijkt door het feit, dat het gehalte aan *schillen* van het residu wisselt met de graad van omzetting, zoodat zonder meer niet is te zeggen hoeveel meel in het residu is achtergebleven. Men kan echter aannemen, dat in die gevallen, waarin alle meel wordt teruggevonden, het residu voor 100 % uit schillen bestaat; in de gevallen N<sup>o</sup>. 9 van tabel I en N<sup>o</sup>. 10 van tabel III bedraagt het residu resp. 7,1 en 7,6 % van de oorspronkelijke stof, zoodat men kan aannemen, dat de pulp aanvankelijk 7,35 % schillen bevatte.<sup>1)</sup> Het zetmeelgehalte van de oorspronkelijke pulp bedraagt 66,9 %, waarbij echter de schillen zijn meegerekend. Het zetmeelgehalte van de zuivere schilvrije pulp bedraagt meer en wel 72,4 %.

1) Dat in n<sup>o</sup>. 10 het vezelresidu iets minder bedraagt wijst wellicht op een geringe aantasting er van door de bacteriën, alhoewel in het algemeen de verkurkte cellen, waaruit de schil bestaat, zeer moeilijk aantastbaar zijn.

Het na de omzetting overgebleven residu bevat steeds al de schillen en wisselende hoeveelheden van onaangetaste zuivere pulp. Wanneer men dus van het residu de schillen aftrekt en de rest beschouwt als zuivere pulp kan men het in het residu achtegebleven meel berekenen.

Ter toelichting een voorbeeld: Bij de 6e overenting is vrijgemaakt 6,2 gr. meel en overgebleven 1,66 gr. residu. De oorspronkelijke pulp bevatte 7,35 % of 0,81 gr. schillen op 25 gr. nat materiaal. Het residu bevatte dus 0,85 gr. zuivere pulp met 72,4 % meel, of wel 0,62 gr. meel.

Vrijgemaakt werd 6,2 gr. meel, zoodat verloren is door bacterieele aantasting  $7,29 - (6,2 + 0,62) = 0,48$  gr. of 6,5 %.

De kolom, welke aangeeft hoeveel meel verloren is gegaan, is dus voor de beoordeeling van het verloop der omzetting belangrijk.

Men ziet dus, dat bij deze eerste reeks van proeven gemiddeld 90,4 % van het totaal aanwezige zetmeel is vrijgemaakt en slechts 4,9 % verloren is gegaan. Dit bedrag is veel geringer dan de hoeveelheid meel, die anders in de vezelgaten door bacteriologische omzetting verdwijnt.

Het was wenschelijk om te weten of de eerste overenting van de cellulose bacteriën, welke in het onderhavige geval na 48 uur was geschied, wellicht na korteren tijd kon geschieden, terwijl tevens is nagegaan wat de opbrengsten werden wanneer de overenting na drie dagen plaats vond. De resultaten vindt men in onderstaande tabel.

TABEL II.

## A. 1e overenting na 24 uur, overige na 22 uur.

Overinenting Nr.	Meel gr.	Meel %.	Residu gr.	Residu %.	Meel verloren %.	Door bact. opgel. %.
1 . . . . .	2.75	37.7	7.19	66.0	0.0	8.8
2 . . . . .	3.34	45.8	6.39	58.6	0.0	10.7
3 . . . . .	3.34	65.8	6.22	57.1	0.0	12.6
4 . . . . .	3.54	48.6	6.05	55.5	0.0	12.0

## B. 1e overinenting na 72 uur, overige na 22 uur.

1 . . . . .	6.80	93.5	0.70	6.4	6.5	31.2
2 . . . . .	5.96	81.9	1.48	13.6	11.8	31.6
3 . . . . .	1.95	26.8	7.59	69.6	6.1	12.5
4 . . . . .	4.56	62.6	3.78	34.7	7.8	23.5
5 . . . . .	5.96	81.9	1.42	13.0	12.5	32.5
6 . . . . .	6.16	83.5	1.97	18.1	5.6	25.4

Uit de resultaten van deze overentingen zien wij, dat wanneer na 24 uur de pas aangelegde cultuur wordt overgeënt, nergens zelfs 50 % van het aanwezige meel wordt vrijgemaakt en het residu overal ook meer dan de helft van de oorspronkelijk toegevoegde pulp bedraagt.

Merkwaardig is, dat in deze cultuur blijkbaar de bacteriën, die het meel aantasten geen gelegenheid gehad hebben zich te ontwikkelen, daar nergens meel is verloren.

Anders is dit in de cultuur, waarvan de eerste overenting 72 uur gestaan heeft; hier ziet men overal meelverlies door bacterieele omzetting, terwijl de hoeveelheden meel die worden vrijgemaakt sterk wisselen en meest ver beneden de in tabel I gevonden waarden blijven. Men krijgt den indruk, dat zich hier een microbenflora ontwikkeld heeft, welke niet zoo zeer de celwanden, als wel de uit de cellen vrijgekomen producten, het zetmeel inclusief, aantast. Dit blijkt o.a. ook uit de verhouding tusschen de hoeveelheid materiaal door de bacteriën opgelost en het vrijgemaakte zetmeel. In tabel I bijv. is in de 7e overenting 95,1 % van het meel vrijgemaakt en 24,5 % van de totale vaste stof opgelost. In de 4e overenting van tabel II B is slechts 62,6 % meel vrijgemaakt en 23,5 % van de oorspronkelijke stof tot verdwijnen gebracht.

Uit deze proeven is duidelijk gebleken, dat een eerste overenting na ongeveer 48 uur het meeste kans op een reeks goed loopende cultures geeft.

Een tweede reeks op deze wijze aangezet had het verloop, zooals in de tabel is aangegeven.

TABEL III.

Overinenting Nr.	Meel gr.	Meel %.	Residu gr.	Residu %.	Meel verloren %.	Door bact. opgel. %.
1. 48 u. . . . .	6.36	87.4	1.69	15.5	2.6	26.1
2. 22 u. . . . .	7.15	98.2	1.51	13.9	0.0	20.6
3. idem. . . . .	6.90	94.7	1.65	15.1	0.0	21.6
4. . . . .	5.98	82.2	1.24	11.4	13.7	34.7
5. . . . .	6.10	83.7	1.50	13.8	2.5	29.4
6. . . . .	6.60	90.6	—	—	—	—
7. . . . .	7.00	96.2	1.47	13.5	0.0	22.3
8. . . . .	6.96	95.6	—	—	—	—
9. . . . .	7.30	100.0	0.82	7.6	0.0	26.4
10. . . . .	7.15	98.2	0.91	8.4	0.0	26.0
11. . . . .	6.97	95.7	1.02	9.4	2.2	26.7
12. . . . .	6.79	93.2	1.08	9.4	4.2	27.8
13. . . . .	5.52	73.9	1.52	14.0	17.4	35.4
14. . . . .	5.35	73.5	1.44	13.2	20.5	37.7
15. . . . .	6.76	93.0	1.80	16.5	0.0	21.5
16. . . . .	7.19	98.8	1.11	10.2	0.0	23.9
Gemiddeld. . . . .	6.63	90.9	1.34	12.8	4.5	27.2

Meer dan 90 % van het meel kan op deze wijze binnen 24 uur uit de pulp worden vrijgemaakt, terwijl gemiddeld niet meer dan 4,5 % van het meel verloren ging.

Bij de overenting moet men er op letten, dat dit niet gebeurt te lang nadat de groote massa van de pulp uiteen gevallen is; soms was dit reeds

na 18 uren het geval. Op dat oogenblik bevat de cultuur enorme hoeveelheden werkzame bacteriën, terwijl wanneer men te lang wacht andere bacteriën de overhand krijgen, wat waarschijnlijk de oorzaak is, dat de 13e en 14e overenting minder succesvol zijn geweest en vrij veel meel verloren is gegaan.

#### *Het meel.*

Uit nevengeande foto's in fig. V kan men duidelijk zien, dat men bij een goed verloopende omzetting niets meer overhoudt dan het meel eenerzijds en een dun laagje bezonken schillen anderzijds.

De kwaliteit van het meel ligt tusschen die van supra en prima in, hoewel er meer kleine korrels in voorkomen.

Figuur V B stelt voor een gemiddeld monster meel verkregen langs bacteriologische weg uit een serie overentingen, die drie weken achtereen uitstekend verliepen; zooals duidelijk te zien is verschilt het niet noemenswaard van het standaard suprameel in fig. V A.

De derde microscopische opname C is van meel afkomstig uit een serie, waarin de pulp behoorlijk ontleed werd, doch waar het meel zich herhaaldelijk vlokkig afzette en omgeven was door bacteriën. Men ziet hoe in dit preparaat de zetmeelkorrels „geëtt” zijn, wat veroorzaakt is geworden doordat de cultures met een snelgroeijende zetmeelaantastende bacterie geïnfecteerd waren. Als handelsproduct zou dit meel tot de inferieure kwaliteiten behooren.

#### *Protozoen infecties.*

Tot aan de 23e overenting van de beide cultuurreeksen van tabel I en III waren de omzettingen glad verlopen, daarna trad een vermindering van de omzetting in en bij de 25e overenting was de pulp grotendeels onaangetast gebleven, zooals uit onderstaande analyses duidelijk blijkt:

TABEL IV.

Overenting N <sup>o</sup> .	Meel in gr.	Meel in °.	Residu gr.	Residu %	door bact. opgel.
25 <sub>I</sub>	1,12	15,8	7,93	74,9	9,3 %
25 <sub>II</sub>	0,07	13,7	7,28	68,7	17,6 %

Bij microscopische contrôle van de vloeistof bleek, dat de cultures vol zaten met kleine protozoen, terwijl zoo goed als geen bacteriën meer voorkwamen. Het is duidelijk, dat deze laatsten door de protozoen waren opgegeten en vrijwel quantitatief tot verdwijnen waren gebracht, waardoor de slechte omzetting gemakkelijk te verklaren was.

Deze infectie was buitengewoon hardnekkig, zoo zelfs, dat het gedurende eenigen tijd uiterst moeilijk was om goed werkende cultures op gang te houden. Na korteren of langeren tijd kregen de protozoen steeds weer de

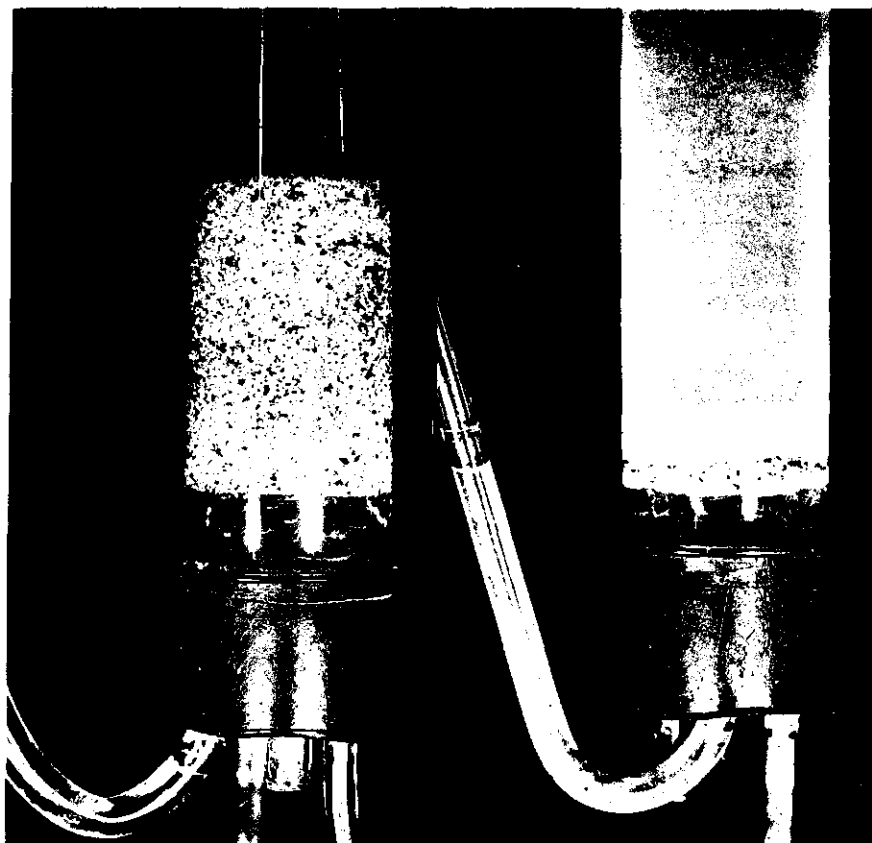
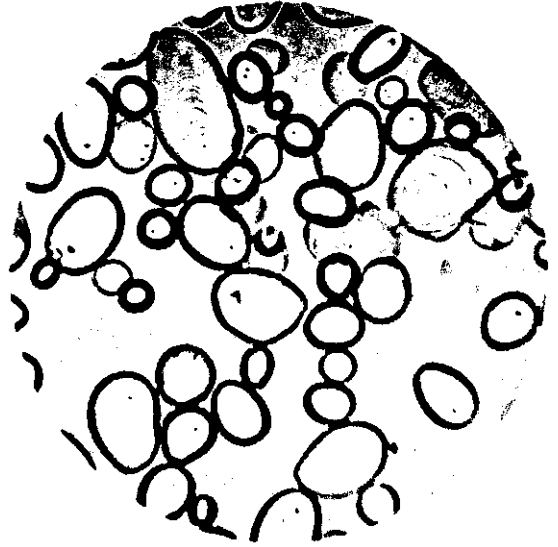


Fig. IV. Links het ondereinde van een kolf met doorlucht buizen waarin de pulp bezonken is, vóór de omzetting.  
Rechts dezelfde pulp na de omzetting waarbij alleen meel en een dun laagje schillen is overgebleven (na 22 uur).

Fig. V. Microfoto's van meel van



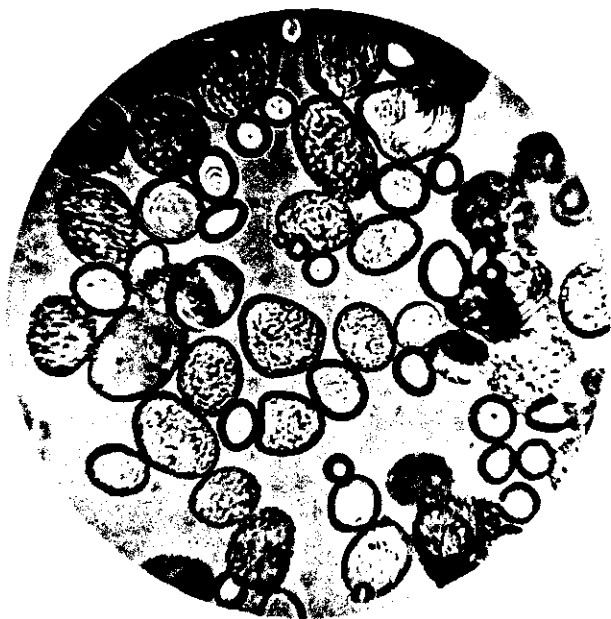
A. Een standaardmonster suprameel.



B. Een gemiddeld monster meel langs bacteriologische weg verkregen.  
Geen noemenswaard verschil met A.



verschillende herkomst (280  $\times$  vergroot).



C. Een monster meel uit een reeks omzettingen welke met een zetmeelaantastende bacterie geïnfecteerd waren. Let op de talloze geëtste korrels.

overhand, daar het niet mogelijk bleek de pulp zonder meer er geheel vrij van te krijgen.

Ten einde de protozoen kwijt te raken werd geprobeerd in hoeverre ze tegen hoogere temperaturen bestand waren. Bij 36° C. bleken ze na korten tijd verlamd; wanneer echter werd overgeënt met een protozoenhoudende cultuur, die gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op 36° was verwarmd, dan waren na  $1\frac{1}{2}$  dag de protozoen weer aanwezig.

Verwarming op 40° had evenmin het gewenschte effect; op 43° bleven de protozoen gedurende één overenting weg, doch verschenen weer in de 2e overenting. Bovendien verliep de omzetting langzaam, zoodat ook de bacteriën geschaad waren.

KCN, dat voor de meeste levende organismen geldt als een zeer giftige stof, bleek evenmin voor ons doel geschikt, daar ook de bacteriën geschaad werden. 340 m.gr. per liter was voldoende om de protozoen te doden, terwijl ze bij 110 m.gr. nog in leven bleven.

Dezelfde moeilijkheid n.l., dat protozoen de werkzame bacteriën verblinden schijnt soms op te treden bij de afvalwaterreiniging volgens het activated sludge procedé. Door FAIRBROTHERS <sup>1)</sup> wordt het gebruik van bepaalde kleurstoffen aangeraden, die de eigenschap hebben wel de protozoen, doch niet de bacteriën te doden. Van Meldolablaauw bijv. wordt opgegeven, dat het in een concentratie van 1 : 2000 à 5000 geen bacteriën meer doodt en in een concentratie van 1 : 20 000 nog wel de protozoen doet afsterven.

Enkele orienteerende proeven met verschillende der opgegeven kleurstoffen gaven geen hoopvolle resultaten, daar in de gevallen waarin de protozoen gedood waren, ook de bacteriën belangrijk in werkzaamheid hadden ingeboet. Daar bovendien een eventuele toepassing van kleurstoffen in de practijk vanwege de groote quantiteiten toch als uitgesloten beschouwd moest worden, werd getracht de oplossing langs anderen weg te vinden.

Een mogelijkheid lag wellicht in het feit dat de snelheid waarmee de bacteriën zich vermenigvuldigen in den aanvang beduidend grooter is dan die waarmee de protozoen zich vermeerderen.

Een eerste poging in die richting bestond daarin, dat de oorspronkelijke cultuur iets vroeger werd afgebroken en wel op het oogenblik, dat een klein gedeelte van de pulp nog *niet* uiteengevallen was. De celwanden van deze pulp waren reeds zeer sterk aangetast en zaten reeds vol bacteriën; de pulp werd nu afgezeefd op een zeef van  $\frac{1}{2}$  mm., voorzichtig afgespoeld, waarbij het grootste gedeelte der protozoen verdween, en daarna gebruikt voor enting van een nieuwe hoeveelheid pulp.

De oude pulp viel dan na enkele uren geheel uit elkaar, waarbij zich groote hoeveelheden werkzame bacteriën plotseling in het cultuur medium verspreidden.

Het gelukte echter niet om op deze wijze flink werkende cultures te krijgen, de omzettingen verliepen minder intens dan die uit de eerste reeksen. Nu was reeds bij het gebruik van reincultures gebleken, dat de omzettingen met meer resultaat verliepen, wanneer naast de celluloseaantastende bacteriën eiwitaantastende bacteriën voorkwamen. Deze waren bij

1) Journ. Soc. Chem. Ind. Vol. 41. 134 T.

het afspoelen van de pulp blijkbaar ook grootendeels verwijderd, waardoor de omzetting te eenzijdig werd.

Om hieraan tegemoet te komen werd nu in plaats van met de overgeschoten sterk aangetaste pulp alléén, bovendien nog geënt met 50 cc. van de vorige cultuurvloeistof. Hierin zaten wel is waar ook protozoen, doch slechts een vijfde van het aantal dat anders werd toegevoegd in 250 cc. entvloeistof. Bovendien braken na enkele uren de cellulose bacteriën in groote getale los en wanneer nu bij de overentingen zorg werd gedragen om de cultuur vooral niet langer te laten doorgaan als noodig was om het zetmeel grootendeels vrij te maken, werd op deze wijze, ondanks de aanwezigheid der protozoen, een reeks goed werkende cultures verkregen. In sommige gevallen was reeds na 18 uren de omzetting afgelopen; het meel in deze reeksen was van goede kwaliteit, niet of weinig geëtt, doch in sommige gevallen omgeven door bacteriënmassa's, waardoor het zich moeilijker afzette. Na behandeling met een weinig chloorwater was dit bezwaar opgeheven en werd een meel verkregen van goede kwaliteit.

#### *De mogelijkheid van technische toepassing.*

Uit een onderzoek in het laboratorium kan men zonder meer geen conclusies trekken omtrent een eventuele technische toepassing.

Per ton vezels zou noodig zijn ongeveer 9 M<sup>3</sup> water, 10 KG zwavelzure ammoniak en 10 KG fosphaat (hiervoor is ook slakkemeel te gebruiken) en wordt geproduceerd gemiddeld 60 KG watervrij meel of 75 KG handels meel van 20 pct. watergehalte.

Een fabriek die per etmaal 20 ton pulp produceert zou noodig hebben een tweetal kuipen van 100 M<sup>3</sup> elk en produceert hiermee ongeveer 15 baal meel per dag, terwijl de afwerking tegelijk zou kunnen geschieden met de winning van het meel uit de aardappels.

Er is geen ander residu dan alleen de schillen, de nacampagne zou kunnen vervallen; hiertegenover staat dat de kans om door infecties met zetmeel-aantasters en protozoen bedrijfsstagnatie te krijgen, zeer groot is en niet is uit te sluiten, omdat de pulp niet gesteriliseerd kan worden, alhoewel een SO<sub>2</sub> behandeling, zoals die in een aantal fabrieken wordt toegepast, hieraan ten deele tegemoet zou kunnen komen.

Bovendien is het eindproduct een tweede kwaliteit meel; het effect zou wel kunnen zijn een grootere rentabiliteit van het bedrijf, doch geen toename van de stabiliteit zou het gevolg ervan zijn.

Dit is de reden dat gezocht werd naar andere methoden om uit het zeer waardevolle en betrekkelijk goedkoope zetmeel in de aardappelpulp voorhanden, producten te maken van geheel anderen aard, die hetzij in chemie of techniek een ruime afzet zouden kunnen vinden.

Daar oriënteerende proeven in die richting succesvol verliepen, zijn de onderzoekingen over meelbereiding langs bacteriologischen weg voorloopig gestaakt.

#### *Samenvatting.*

Een methode werd uitgewerkt waarbij met behulp van goedwerkende cultures van aerobe cellulose bacteriën uit de pulp der aardappelmeelfabri-

ken gemiddeld 90,7 % van het daar in aanwezige meel kon worden vrijgemaakt, terwijl het residu bijna uitsluitend bestaat uit aardappelschillen. Gemiddeld werd 4,7 % van het totaal aanwezige meel verloren. De gevolgde methode bestond hierin dat men uitgaande van paardemest een ruwcultuur maakt van cellulosebacteriën, deze herhaaldelijk overent, eventueel een rein-cultuur maakt, wat echter voor het welslagen van de proeven geen vereischte is, en de intensiteit van deze cultuur zoo hoog mogelijk opvoert door constant lucht door te leiden. Met deze cultuur infecteert men een pulp suspensie welke per liter ongeveer 25 gram pulp bevat (vaste stofgehalte 11 gr) benevens 0,1 % zwavelzure ammoniak en 0,1 %  $K_2HPO_4$ .

Na 48 uur wordt de cultuur overgeënt, terwijl bij de daarop volgende overentingen de omzettingen binnen 24 uur beëindigd is, soms zelfs reeds na 18 uur al het in de pulp aanwezige meel in vrijheid is gezet.

Het meel is van goede kwaliteit; voor de winning uit de cultuur werd een slijbmolentje geconstrueerd dat een snelle quantitieve afscheiding van het meel mogelijk maakte.

Door infectie met zetmeelaantastende bacteriën traden soms belangrijke verliezen en beschadiging van het meel op. Infecties met protozoen, welke meerdere malen al de werkzame bacteriën verslonden, zetten het proces geheel stil. Door een bepaalde wijze van overenten kon men dit voorkomen; hierbij breekt men de vorige omzetting af, als er nog een weinig pulp niet uiteengevallen is. Deze pulp wordt, na schoonspoelen, gebruikt voor de enting van de volgende cultuur, en door het groote aantal bacteriën, dat bij het uiteenvallen der entingspulp plotseling vrijkomt, kan men de protozoen op den achtergrond houden. Een kleine hoeveelheid van de vorige cultuurvloei-stof was noodig bij de enting daar voor een snelle omzetting niet alleen celluloseaantasters, doch tevens eiwitaantastende bacteriën noodig zijn.

Een technische toepassing van het procede binnen de grenzen van economische rentabiliteit lijkt niet uitgesloten, doch riskant vanwege de moeilijk te vermijden bovengenoemde infecties.