

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

Over een gebrek van handelsstremsel

DOOR

DR. W. VAN DAM.

Bij het onderzoek van een monster stremsel op stremkracht werd een abnormaal laag cijfer gevonden. De oorzaak hiervan bleek te zijn, dat de oplossing 1:20, die voor het onderzoek gebezigd wordt, eenige minuten in het waterbad van 35° C. gestaan had, waardoor de sterkte van het enzym belangrijk achteruit bleek te gaan. De oplossing van het stremselpoeder, die als normaalvloeistof dienst deed, vertoonde dit verschijnsel niet. Bij het naslaan der literatuur bleek, dat door Siegfeld¹⁾ hetzelfde is gevonden; hij geeft verscheidene bepalingen op, die wijzen op een sterken teruggang van het enzym, wanneer langer of korter op 40° en 37,5° C. werd verwarmd. Tevens toonde hij aan, dat door gebruik van 10 à 20 pCt. keukenzoutoplossing in plaats van water voor de verdunning van de leb, het gebrek wordt opgeheven. Over de oorzaak van het verschijnsel zegt deze schrijver: „Die mitgeteilten Versuchsergebnisse legen die Annahme nahe, dasz an der Zersetzung, b.z.n. Abschwächung des Labferments hydrolytische Zersetzungen einen Anteil haben.” Hierdoor blijft echter de vraag onbeantwoord, waarom het eene stremsel wèl, het andere niet verandert. Daar ik hierover een vermoeden had, dat, zoo het juist was, ook voor de geconcentreerde oplossingen een achteruitgang, zij het ook veel langzamer, kon doen verwachten, heb ik in verband met het boven omschreven verschijnsel een meer uitvoerig onderzoek verricht.

In de eerste plaats was de vraag te beantwoorden: heeft de achteruitgang ook plaats, wanneer de leb aan de melk is toegevoegd? Was dit het geval, dan zou dus bij het stremmen bij het kaasmaken, het enzym gedurende de inwerking, die 25 tot 40 minuten duurt, sterk moeten achteruitgaan. Om dit na te gaan werd van de volgende redeneering uitgegaan. Als het stremsel *gedurende* de inwerking op de caseïnekalk zwakker wordt, kan

¹⁾ Milchwirthschaftl. Centralblatt III. 426.

niet voldaan worden aan de zoogenaamde „tijdwet” voor de stolling d.w.z. de stremmingstijden zijn dan niet meer omgekeerd evenredig met de lebconcentratie. Dit nu bleek wel het geval te zijn. Ook als volgt werd nog aangetoond, dat er geen teruggang plaats heeft na de menging met de melk. Van het normaal *stremsel*poeder, welks oplossing in water bij verwarming niet veranderde in stremkracht, werd zooveel in water opgelost, dat de vloeistof ongeveer evenveel enzym bevatte als de oplossing 1:20 van het vloeibare *stremsel*. Van deze beide oplossingen werden de stremtijden bij 25° en 36,5° C. vergeleken. De verhouding was in beide gevallen bijna dezelfde, waaruit met zekerheid volgt, dat gedurende het stremmen het enzym niet verzwakt.

25 c.M³. melk + 1 c.M³. leb (norm.) bij 25° C. stollen in 10 min.
 „ „ + „ „ (vloeibaar) bij 25° C. stollen in 10½ min.
 „ „ + „ „ (norm.) bij 36,5° C. stollen in 5½ min.
 „ „ + „ „ (vloeibaar) bij 36,5° C. stollen in 5¾ min.

In de tweede plaats moest nu worden nagegaan, waarom het eene preparaat niet, het andere wel teruggaat. Daar het bekend is, dat het lebenzym zeer gevoelig is voor alcali, lag het voor de hand, te onderzoeken, of wellicht eene alcalische reactie van de oplossing 1:20 de oorzaak van het verschijnsel kon zijn. Tegenover lakmoes toonden eenige monsters die toevallig in het laboratorium aanwezig waren, alle eene min of meer alcalische reactie, terwijl er daaronder toch een paar waren, welke zonder bezwaar een half uur op 35° C. gehouden konden worden in de boven aangegeven concentratie. Nu was mij bij een onderzoek over den invloed der aciditeit op de stollende werking van *stremsel* gebleken, hoe de activiteit van het enzym afhangt van enorm kleine verschillen in concentratie van de H-ionen, en als vanzelf drong zich nu de vraag op: wordt misschien het lot van het ferment bij de gebruikte temperatuur van 35° C. beslist door zoo geringe verschillen in hydroxylionenconcentratie, dat die door lakmoes niet voldoende worden aangewezen? Ter beantwoording van deze vraag liet ik van 6 verschillende fabrieken een monster *stremsel* komen, waarvan de oplossing 1:20 op teruggang werd onderzocht door ze gedurende een half uur in een thermostaat bij 35° C. te plaatsen. Gelijkzeitig werd het hydroxylionengehalte bepaald. Dit kan geschieden door gebruik te maken van zuurstofelectroden op dezelfde wijze als vroeger ¹⁾ werd aangegeven voor waterstofelectroden. Het werken daarmee is echter in vele opzichten lastig en vooral de aanwezigheid van het keukenzout in het *stremsel*, dat bij zuurstofelectroden op nog onverklaarde wijze storend werkt, deed mij besluiten, ook voor dit geval met H-electroden te werken en uit de gevonden con-

¹⁾ Beitrag zur Kenntnis der Labgerinnung. Z. f. physiol. Chemie. Bd. 53, 295. Zie ook deze verslagen No. V.

concentratie aan H-ionen, die der OH-ionen te berekenen. Voor eene vloeistof, waarin zich H- en OH-ionen bevinden, moet bij kamertemperatuur het product der concentraties 1×10^{-14} bedragen, zoodat uit het H-ionengehalte door eene eenvoudige deeling het OH-ionengehalte wordt gevonden.

Tabel 1 geeft de verkregen uitkomsten aan.

Tabel I.

10 c.M³. melk + 1 c.M³. stremsel (1:20) bij 35° C.

	T ₁ .	T ₂ .	C _H .	C _{OH} .
1.	81"	113"	67×10^{-9}	$1,5 \times 10^{-7}$
2.	86"	87"	93×10^{-8}	$0,11 \times 10^{-7}$
3.	82"	81"	20×10^{-8}	$0,5 \times 10^{-7}$
4.	76"	79"	12×10^{-8}	$0,8 \times 10^{-7}$
5.	76"	79"	25×10^{-8}	$0,4 \times 10^{-7}$
6.	88"	217"	34×10^{-9}	3×10^{-7}

T₁ en T₂ geven de stollingstijden aan voor en na de verwarming.

Beschouwen we deze tabel, dan blijkt dat voor die nummers, welke achteruitgang vertoonen, ook eene alcalische reactie t.o.v. het absoluut neutrale punt $C_H = C_{OH} = 1 \times 10^{-7}$, gevonden wordt, waardoor dus mijn vermoeden wel als juist beschouwd kan worden¹⁾. Bovendien bleek trouwens, dat toevoeging van een weinig HC₁ vóór de verwarming, het bezwaar wegnam²⁾. Toen eenmaal gevonden was in welk concentratiegebied de onderzochte oplossingen zich bewogen, kon met behulp van de door Salm³⁾ opgestelde indicatortabel, die indicator worden uitgezocht, die de verschillen in aciditeit duidelijk moest aangeven. Rosolzuur bleek voor dit doel geschikt. Volgens de metingen van Salm wordt eene oplossing met eene concentratie aan H-ionen van 1×10^{-8} rood, van 1×10^{-7} rose en van 1×10^{-6} lichtbruin getint. Van de boven besproken oplossingen kon dus voor de nummers 1 en 6 eene nog duidelijke rosekleuring worden verwacht, terwijl dit voor de overige nummers niet, of slechts in uiterst geringe mate het geval moest zijn. Bij toevoeging van 0.1 c.M³. rosolzuuroplossing, van de gebruikelijke sterkte 1:500 (80 pCt. alcohol) per 20 c.M³. oplossing, werden No. 1 en 6 *duidelijk* rose, terwijl 4 al niet meer roodachtig kon worden genoemd, een resultaat dus, volkomen in overeenstemming met de metingen. Ook niet geoefende waarnemers rangschikten de 6 buisjes, waaraan de indicator was toegevoegd, zonder aarzelen in de

¹⁾ Hiermede is niet bedoeld, dat in een absoluut neutraal medium de ontleding van het enzym niet zou plaats hebben; men kan alieen een veel langzamer teruggang verwachten.

²⁾ De fabrikant van No. 6 deelde me later mede, dat het hem gebleken was, dat het door hem gebruikte keukenzout voor de extractie, duidelijk alcalisch reageerde!

³⁾ Studie über Indicatoren. Z. f. Physik. Ch. 57 (1907), 471.

volgorde, die door de gevonden OH-ionenconcentraties kon worden verwacht. Ik vermeld hier deze uitkomst, omdat het zeer zeker aanbeveling verdient, bij het onderzoek van stremsel, behalve de stremkracht, ook na te gaan, of de reactie niet te sterk alcalisch is; in het rosolzuur hebben we daarvoor een eenvoudig middel.

Hoewel dus door het medegedeelde het verschijnsel voldoende verklaard was, leek het mij wenschelijk eens na te gaan, hoe zich de verschillende stremfels bij ongeveer dezelfde alcaliteit gedroegen tegenover verwarming en tevens, of een preparaat, dat in den handel als een zeer zuiver product bekend staat, zich evenzoo gedroeg. Daartoe werd van een stremfelpoeder van Hansen eene oplossing gemaakt van ongeveer gelijke enzymconcentratie als die van de overige monsters, terwijl alle oplossingen, onder de noodige voorzorgen met zooveel alcali werden behandeld, dat een hydroxylionenconcentratie werd verkregen, die zooveel mogelijk¹⁾ gelijk was aan die bij No. 6 gevonden, n.l. 3×10^{-7} norm. Deze oplossingen werden dan onmiddellijk op teruggang onderzocht. Tabel II geeft de resultaten aan. No. 7 is het Hansenstremfel.

Tabel II.

	T ₁ .	T ₂ .	C _{OH} × 10 ⁷ .	Teruggang in pCt.
1.	70"	155"	2,3	55
2.	99"	132"	—	25
3.	81"	104"	2	12
4.	77"	120"	—	36
5.	90"	120"	—	25
6.	88"	217"	3	60
7. 2)	81"	89"	4,4	9

Hoewel het te groote verschil in alcaliteit, zooals uit de vierde kolom te zien is, eene nauwkeurige vergelijking niet toelaat, is toch met een oogopslag te zien, dat de verschillende stremfels zich zeer verschillend gedragen ten opzichte van hydroxylionen. Vergelijken we b.v. 1 en 3, dan blijkt duidelijk, dat 3 veel minder gevoelig is dan 1, maar vooral springt in het oog de betrekkelijke bestendigheid van 7, waarvoor opzettelijk (na oriënteerende bepalingen) een hooger OH-ionengehalte gekozen werd.

Aanvankelijk meende ik dit zoo te moeten verklaren, dat de gevoeligheid voor alcali afhankelijk zou zijn van meerdere of mindere verontreiniging van het enzym; bij preparatieven arbeid

¹⁾ Zooals duidelijk zal zijn, is het verkrijgen van volkomen dezelfde concentratie een uiterst tijdroovend werk; ik volstond dus met de in Tabel II gegeven cijfers. Voor de nummers 2, 4 en 5 ben ik colorimetrisch te werk gegaan.

²⁾ Eigenlijk is gevonden 81" en 97" bij verhitte gedurende 1 uur en 7 min. Het boven aangegeven getal kan niet veel afwijken van de werkelijke waarde.

op organisch-chemisch gebied toch heeft men om zoo te zeggen dagelijks met dit verschijnsel te kampen. Bij deze veronderstelling werd dus uitgegaan van de meening, dat stremsel 7 als het meest zuivere product moest worden beschouwd. In een gesprek met Prof. Pekelharing te Utrecht, wees deze mij er echter op, dat, hoewel het door mij gebruikte stremselpoeder misschien als een uitstekend product voor het doel, waarvoor het gefabriceerd wordt kan worden beschouwd, dit geenszins een bewijs was voor de zuiverheid van het enzym als zoodanig. Bij een uitvoerig onderzoek toch, door Gewin¹⁾ verricht in het physiologisch laboratorium te Utrecht, is gebleken, dat de gevoeligheid voor alcali grooter wordt, naarmate het ferment van verontreinigingen is gezuiverd. Gaarne heb ik dan ook gebruik gemaakt van het aanbod van Prof. Pekelharing, om een deel van het door mij gebruikte stremselpoeder 7, te reinigen volgens eene vroeger door hem gevonden methode. Het resultaat was, dat dit product, volgens Tabel II zeer bestand tegen de werking van OH-ionen in vergelijking met de overige monsters, na reiniging een product leverde, dat alle andere monsters overtrof in snelheid van ontleding door kaliumhydroxyde. De uitkomsten van Tabel II zijn dus zoo te verklaren, dat het verschil in gedrag tegenover de OH-ionen een gevolg is van meerdere of mindere verontreiniging van de verschillende stremfels, in dien zin, dat de minst gevoelige (No. 7 en 3 b.v.) als de meest verontreinigde beschouwd moeten worden. Dat hier niet een verschil in gehalte aan keukenzout, waarvan reeds gezegd is, dat het eene beschuttende werking uitoefent, de oorzaak is, bleek nog uit de gevonden chooldcijfers; trouwens, waar eene oplossing van 1:20 werd gebruikt, was de concentratie daarvoor in ieder geval te klein. Voor de onverdunde stremfels echter, die tot 20 pCt. NaCl bevatten, kan wel aangenomen worden, dat het keukenzout, behalve eene conserveerende werking in den gewonen zin, t.o.v. micro-organismen dus, ook nog de bovenbedoelde beschermende werking uitoefent. Dit bleek b.v. nog bij een experiment met een monster van dezelfde fabriek, die No. 6 geleverd had. Het vertoonde de teruggang in nog sterker mate, n.l. onverhit 90", na 1/2 uur in den thermostaat gestaan te hebben 300". Dit preparaat werd in een dialysator gedurende 2 x 24 uren gedialyseerd; 1 c.M³. van het bijna zoutvrije stremsel leverde, *onverdund*, een stremtijd van 71". Wel is waar werd hier andere melk gebruikt, maar daar alle proeven met gemengde melk van 20 tot 30 koeien van de proefzuivelboerderij werden genomen, kan aangenomen worden, dat in het vermogen om te stollen met leb, geen groot verschil bestaan heeft. Trouwens, als men de groote verdunning 1:20 in aanmerking neemt, dan blijkt in ieder geval overtuigend de sterke verzwakking van het enzym, ook in de geconcentreerde oplossing zoodra het zout verwijderd is.

¹⁾ Zeitschr. f. physiol. Chemie 54. 32.

Eene vraag nu, voor de praktijk van belang, is deze:

Is bij een alcalisch reageerend stremsel, zooals b.v. voor No. 6 gevonden was, de beschermende werking van het keukenzout tegen ontleding, zoo volledig, dat, niettegenstaande de aanwezigheid der OH-ionen, het stremsel toch gedurende geruimen tijd zijne stremkracht behoudt?

Vooraf ook in verband met het feit, dat mij van verschillende zijden klachten ter oore kwamen over het stremsel, waarvoor ik juist bij herhaling eene alcalische reactie vond, leek het me van belang na te gaan, hoe zich de in Tabel I genoemde preparaten op den duur hielden. Ze werden in een kelder in eene donkere kast bewaard en van tijd tot tijd op stremkracht onderzocht. Het spreekt vanzelf, dat, waar voor vernietiging van een deel van het enzym zeer verschillende oorzaken kunnen bestaan, reeds van te voren kon worden gezegd, dat eene eventueele vermindering van stremkracht voor de alcalisch reagerende monsters, nog niet noodzakelijk aan de alcaliteit kon worden toegeschreven. Toch hebben de hier volgende cijfers eenige waarde. Ze geven de stollingstijden in seconden aan omgerekend op 91" voor de normaaloplossing.

Tabel III.

	14 Sept.	25 Sept.	20 Oct.	20 Jan.	Totale teruggang.
1.	81	80	80,5	84	3,7 pCt.
2.	86	86	88	88,5	2,8 "
3.	82	80	81	86	4,9 "
4.	76	78	85	85,5	12,5 "
5. ¹⁾	—	—	—	—	—
6.	88	92	96,5	96,3	9,4 "
7.	91	91	91	91	—

Hierbij dient opgemerkt te worden, dat zich in No. 4 reeds op 20 October duidelijk bacteriën hadden ontwikkeld, terwijl No. 6 met een mycodermahuidje was bedekt. De overige monsters waren volkomen helder gebleven. Zooals gezegd, de teruggang van 6 kan niet met zekerheid worden toegeschreven aan de alcaliteit; de teruggang van 88" op 92" gedurende de eerste elf dagen na ontvangst is echter verdacht, en de uitkomsten bij 30° C. verkregen, wijzen nog sterker op den invloed der alcalische reactie. De monsters werden daartoe geruimen tijd, van het licht afgesloten, in een thermostaat bij 30° C. geplaatst.

Tabel IV geeft de uitkomsten aan.

¹⁾ Door een vergissing verkeerde monster No. 5 tijdelijk onder andere omstandigheden.

Tabel IV.

	17 Sept.	22 Sept.	29 Sept.	20 Oct.
1.	81	83	85	85
2.	86	87	87	95
3.	82	82	79 (?)	96
4.	76	79	85	91
5. 1)	—	—	—	—
6.	88	96	95	101
7.	91	91	91	91

Zooals blijkt ging hier No. 6 in 5 dagen terug van 88" op 96", in vergelijking met de overige monsters dus zeer sterk. Op 20 October waren alle monsters sterk troebel, behalve 1. Niettegenstaande dit laatste stremsel dus zwak alcalisch reageert, toont het zich verreweg het meest bestendig van alle onderzochte monsters, waaruit dus volgt, dat het mogelijk is, de schadelijke werking der hydroxylionen op te heffen. De alcaliteit van 1 is echter nog beduidend kleiner dan van 6, zooals uit Tabel I blijkt. Toch moet een stremsel, dat alcalisch reageert, beschouwd worden als op ondoelmatige wijze te zijn bereid. Het is mij althans niet bekend, dat er eenig bezwaar bestaat tegen het uittrekken der kalfsmagen met neutrale of zwak zure vloeistoffen.

Ueber einen Fehler von Handelslab. (Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen.)

Es wurde gefunden, dass einzelne Labpreparate in der Verdünnung 1:20, wie sie zur Bestimmung der Stärke hergestellt wird, beim Erwärmen auf 35° C. stark abgeschwächt werden. Bei der Untersuchung sechs verschiedener Muster zeigte sich, dass eben diejenigen, welche eine schwach alkalische Reaction hatten (electrometrisch bestimmt) die obengenannte Erscheinung zeigten. Die kleinen Differenzen im Gehalte an OH-ionen, warum es sich hier handelt, können durch Rosolsäure indiziert werden. Dass die verschiedenen Labessenzen bei gleicher Alkalität nicht gleich stark von der Erwärmung leiden findet ihre Ursache darin, dass die Verunreinigungen der Preparate die Fähigkeit haben, die Enzyme zu schützen. Je reiner das Ferment desto empfindlicher zeigt es sich den Hydroxylionen gegenüber. Wahrscheinlich ist eine zu stark alkalische Reaction dem Enzym auch in konzentrierter Lösung schädlich. Es ist zu empfehlen bei der Untersuchung von Handelslab auch mittels Rosolsäure auf Alkalität zu prüfen.

1) Door een vergissing verkeerde monster No. 5 tijdelijk onder andere omstandigheden.