



Over de verhouding van pepsine tot chymosine

<https://hdl.handle.net/1874/255092>

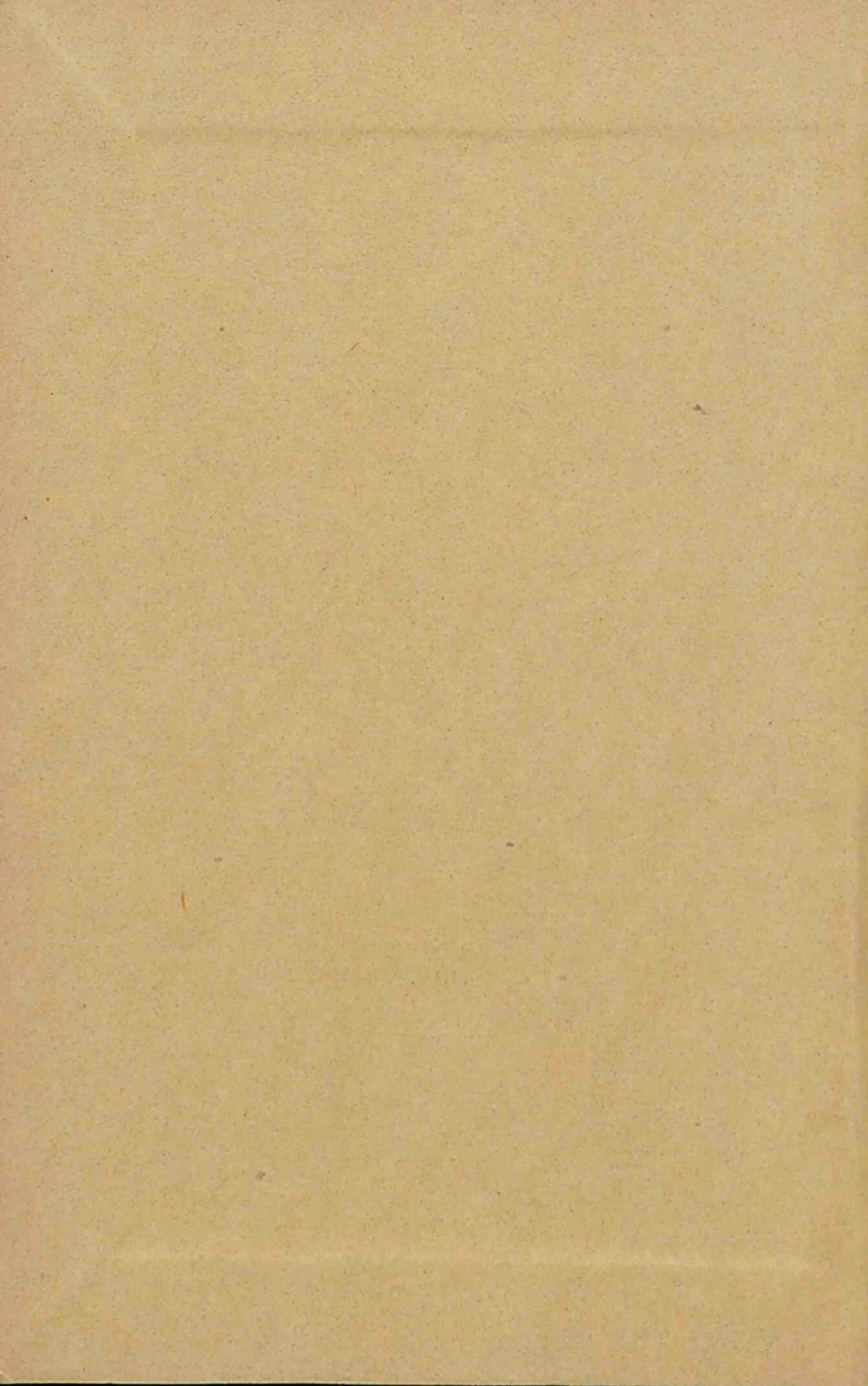
5 4^e 1921

Med. 22 Oct^r 1907

OVER DE VERHOUDING VAN PEPSINE TOT CHYMOSINE

J. W. A. GEWIN

s.
cht



OVER DE VERHOUDING VAN
PEPSINE TOT CHYMOSINE

STOOMDRUKKERIJ - FIRMA A. J. MICHIELSEN - AMERSFOORT.

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT



0374 5969

11

Diss. Utrecht 1907

OVER DE VERHOUDING VAN PEPSINE TOT CHYMOSINE

::: PROEFSCHRIFT :::

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT
NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. W. H. JULIUS, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER
UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VER-
DEDIGEN OP DINSDAG 22 OCTOBER 1907
DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR ==
JAN WILLEM ANTON GEWIN
GEBOREN TE DELDEN ::=====::

== :: A. OOSTHOEK — UTRECHT :: ==



AAN MIJNE OUDERS

Bij het voltooiën van mijn proefschrift is het mij eene diep gevoelde behoefte mijnen dank uit te spreken jegens U, Hoogleeraren en Lectoren der Medische en Philosophische faculteit voor het onderwijs, dat ik van U mocht ontrangen.

Bovenal voel ik mij gedrongen, Hooggeleerde Pekelharing, Hooggeachte Promotor, U mijne erkentelijkheid te betuigen voor de belangstelling, die Gij steeds in mijn werk hebt betoond en voor den raad en steun, die ik nooit te vergeefs bij U zocht. Zoo werd mij het werk tot eene aangename taak.

Hooggeleerde Lameris, dat mij het voorrecht te beurt viel, onder uwe assistenten te worden opgenomen, zal mij steeds met groote erkentelijkheid blijven vervullen. De gelegenheid, mij geboden, onder uwe leiding mijne practische kennis te vermeederen, zal mij later, als ik zelfstandig zal hebben op te treden, zeker tot voordeel zijn. Moge het hun ten goede komen, die zich dan aan mijne zorgen zullen toevertrouwen.

INHOUD.

	Bladz.
INLEIDING	1
LITERATUUR	5
BEREIDING VAN HET ENZYM	25
INRICHTING DER PROEVEN EN BETROUWBAARHEID	
DER UITKOMSTEN	33
EENIGE OPMERKINGEN OVER ANTISTOFFEN	43
HET NEERSLAAN VAN PROTEOLYTISCH EN MELK-	
STREMMEND ENZYM DOOR DIALYSE	47
OVER HET ONDERSCHIED TUSSEN CHYMOSE EN	
PARACHYMOSE	57
OVER DE VERMINDERING VAN PROTEOLYTISCH EN	
MELKSTREMMEND ENZYM DOOR DIGESTIE . . .	73
CONCLUSIES	89
TABEL I, II EN III.	

INLEIDING.

Na de onderzoekingen van Pelouze en Simon in 1840 was men algemeen van meening, dat de kaasstremming het gevolg was van het zuur worden der melk en dus als een secundaire werking van de melkzuurgisting moest worden beschouwd. Hammarsten was de eerste, die aantoonde, dat men te doen had met een specifieke werking van het lebezym op de caseine. Sedert dien tijd is er een vrij omvangrijke literatuur over dit onderwerp en zijne verschillende onderdeelen verschenen. In een zeer groot aantal punten bestaat nog verschil van meening: zelfs ziet men hier en daar de vraag rijzen of de tijd voor dergelijke onderzoekingen wel geacht mag worden reeds te zijn aangebroken, nu de kennis der enzymen in 't algemeen nog als zoo gebrekkig moet worden beschouwd. Zeker ware het bestudeeren der maagenzymen heel wat gemakkelijker, wanneer men, toegerust met eene volledige bekendheid met het wezen en de werkingwijze der enzymen in het algemeen, den arbeid kon beginnen, maar bij gebreke daarvan is men nog niet genoodzaakt alle onderzoek in dit speciale onderdeel te laten varen.

In de laatste jaren is herhaaldelijk de vraag behandeld, of leb, chymosine, als een afzonderlijk, zelfstandig enzym te beschouwen is.

Hammarsten heeft reeds in zijne eerste mededeeling over dit onderwerp deze vraag in bevestigenden zin beantwoord. Hij onderzocht extracten van het maagslijmvlies van zoogdieren en kwam tot het besluit, dat daaruit oplossingen konden worden verkregen, die melk niet meer tot stolling konden brengen, maar wel in staat waren, bij zure reactie, eiwit te verteren, dat dus pepsine van chymosine kon worden gescheiden.

Intusschen werden allengs oude en nieuwe ervaringen aan het licht gebracht, waaruit bleek dat, bij neutrale reactie, melk gestremd kan worden, niet alleen door een enzym van het maagslijmvlies afkomstig, maar ook door het pancreassap, ja door bestanddeelen van allerlei organen van dieren en zelfs van planten. Ook eencellige organismen, bacteriën, bezitten, indien zij tot proteolyse in staat zijn, voor zoover het onderzoek reikt, allen het vermogen uit melk kaas te doen ontstaan¹⁾.

Het samengaan van het vermogen tot proteolyse en tot vorming van kaas uit melk, doet het vermoeden rijzen, dat beide werkingen aan dezelfde stof gebonden zijn.

Mijn onderzoek had ten doel de juistheid van dit vermoeden te toetsen, evenwel uitsluitend met betrekking tot de vraag, of de twee het meest bestudeerde werkingen van het maagsap der zoogdieren, het verteren van eiwit en het doen stollen van melk, aan twee verschillende enzymen, pepsine en chymosine, dan wel aan een enkel moeten worden toegeschreven.

Bij zijn onderzoekingen over pepsine kwam *Pekelharing* tot de, in verband met de mededeelingen van *Hammarsten* verrassende, bevinding, dat pepsine, ook na langdurige digestie met zoutzuur en na zorgvuldige

¹⁾ *Van der Leek*, Centralbl. f. Bakteriöl. II 2e Abt. XVII, S. 370.

zuivering, het vermogen bezit om, bij neutrale reactie, melk te doen stollen.

Nencki en *Sieber*, die deze bevinding bevestigden, spraken de onderstelling uit, dat pepsine te beschouwen zou zijn als een reuzenmolecule, met onderscheidene zijketens, waarvan de eene, bij zure reactie, hydrolyse van eiwit, de andere, bij neutrale reactie, stolling van melk zou kunnen veroorzaken — eene onderstelling, waarbij *Pekelharing*, in eene latere mededeeling, zich aansloot.

Pawlow en *Parastschuk* gingen verder en vatten de vertering van eiwit en de vorming van kaas niet op als het gevolg van werking van tweeërlei atoomgroepen, maar zagen daarin de werking van een en dezelfde stof, onder verschillende omstandigheden.

Sawjalow meende zelfs de vorming van paracaseïne uit caseïne als een beginnende digestie van eiwit te mogen beschouwen.

De voorstanders der dualiteit waren daarmede echter niet overtuigd. Vooral *Schmidt Nielsen* sprong voor de oude opvatting in de bres en door *Bang* werd zelfs een derde enzym in het strijdperk gevoerd, dat hij met den naam parachymosine bestempelde. Dit zou zich door enkele eigenschappen van de chymosine, het gewone lebezym, onderscheiden en als het melkstremmend enzym van bepaalde diersoorten en ook van den mensch zijn te beschouwen. Ik heb mij bij mijn werk in hoofdzaak bepaald tot de laatste twee vragen; of er inderdaad grond bestaat een afzonderlijk parachymosine aan te nemen en of men pepsine en chymosine als een of als twee verschillende stoffen moet opvatten. Dat er zich hierbij moeilijkheden voordoen, moge reeds blijken uit de oneenigheid, die er nog heerscht omtrent deze vragen. Vooral twee bezwaren treden op den voorgrond: de bereiding van

zuivere enzymoplossingen en de juiste bepaling van haar melkstremmend en eiwit oplossend vermogen. Daarom meen ik over deze punten afzonderlijk eenige nadere mededeeling omtrent de door mij gevolgde methoden te moeten doen voorafgaan, alvorens tot de eigenlijke proeven over te gaan. Het enzym heb ik op eenigszins andere wijze bereid, als de meeste onderzoekers. Wat de bepaling der werkzaamheid betreft, heb ik mij gehouden aan de gebruikelijke methoden, terwijl ik door andere combinaties en verschillende inrichting der proeven getracht heb tot meer klaarheid te komen.

Literatuur.

In 1872 publiceerde *Hammarsten* ¹⁾ zijn eerste onderzoek over lebwerking; hij toonde aan, dat het enzym de caseïne zelf aantast en dat dus het ontstaan van melkzuur daarbij geen rol speelt. *Reichel* en *Spiro* ²⁾ bewezen, dat er bij de stremming geen leb verloren gaat, zooals voor echte enzymwerking karakteristiek is. Over dit punt bestaat dan ook geen twijfel. Leb vertoont volgens *Hammarsten* veel overeenkomst met pepsine, doch bezit veel minder weerstandsvermogen tegen verschillende schadelijke invloeden. Daarom is het ook moeilijk pepsinevrije leb te bereiden. Hij slaagde er niettemin in door gefractioneerde praecipitatie met magnesiumcarbonaat of loodacetaat eene oplossing te maken, die wel melk deed stremmen, doch geen eiwit oploste. Door langdurig verhitten tot 40° bij zure reactie wordt leb vernield, terwijl de pepsine grootendeels gespaard blijft. Volgens deze twee methoden kan men volgens *Hammarsten* pepsinevrije leb en lebvrije pepsine maken. Tevens meende hij daarmee bewezen te hebben, dat leb en pepsine twee verschillende stoffen zijn. Deze opvatting heeft onder de verschillende onderzoekers hare voor- en tegenstanders gevonden.

¹⁾ Ueber die Milchgerinnung und die dabei wirkenden Fermente der Magenschleimhaut. Ref. Maly's Jahresberichte, 1872, S. 118.

²⁾ Fermentwirkung und Fermentverlust. Hofm. Beitr. Bd. VI. S. 68.

Pekelharing ¹⁾ beschreef in 1896 eene nieuwe methode om uit maagslijmvliezen zuivere pepsine te bereiden, waarbij werd gebruik gemaakt van de eigenschap van het enzym in zure vloeistoffen op te lossen, terwijl het weer neerslaat als de aciditeit tot zekeren graad daalt. Daar dit ook de door mij gebezigde methode is, zal ik in het volgende hoofdstuk eene meer uitvoerige beschrijving geven. Hoewel de maagslijmvliezen bij de bereiding steeds 5 dagen met zoutzuur gedigereerd werden, en dus volgens *Hammarsten* geen leb meer konden bevatten, was het afgescheiden enzym toch in staat melk te doen stremmen. Wel bleek bij de analyses, dat deze pepsine niet als een zuivere stof mocht beschouwd worden, doch toen het gelukt was uit het maagsap van een fistelhond pepsine te bereiden, die in verscheidene praeparaten een vrij wel standvastige samenstelling bleek te bezitten, vertoonde deze dezelfde eigenaardigheid. ²⁾ Voor verschillende pepsine-praeparaten uit den handel werd hetzelfde gevonden. *Pekelharing* sluit zich daarom aan bij de kort te voren door *Nencki en Sieber* ³⁾ verkondigde opvatting, dat proteolyse en melkstromming werkingen zijn van eenzelfde molecule. Ook zij komen evenals *Pekelharing* tot de conclusie, dat pepsine eene eiwitstof is met zeer labiel en complex samengesteld molecule, dat waarschijnlijk bestaat uit verschillende onderdeelen, waarvan elk de drager van bijzondere eigenschappen is. Zij onderscheiden in zulk een reuzenmolecule, behalve een hoofdmiddelpunt, centra van de

¹⁾ Ueber eine neue Bereitungsweise des Pepsins. Zeitschr. für Physiol. Chemie Bd. XXII, S. 233.

²⁾ Mittheilungen über Pepsin. Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. XXXV, S. 8.

³⁾ Beiträge zur Kenntniss des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme. Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. XXXII, S. 291.

2e, 3e en 4e orde voor de afzonderlijke atomen en bestempelen deze onderdeelen met den naam Seitenmolekel. Een dezer Seitenmolekel zou dan de hydrolytische splitsing van eiwit bewerken, terwijl een andere de drager zou zijn van de lebwerking. Het eiwit splitsende deel zou waarschijnlijk met chloor verbonden zijn; daarvoor pleit, dat de proteolytische werking door verdund alkali reeds wordt vernield.

Pawlow en Parastschuk ¹⁾ onderzochten maagsap, dat zij verkregen uit eene geïsoleerde kleine maag van een hond. Zij vergeleken de verhouding van stremmende en digereerende werking onder verschillende omstandigheden. Voor de bepaling der coagulatie werd het enzym niet geneutraliseerd. Maagsap, dat onder verschillende physiologische omstandigheden, na voeden met brood, met melk en met vleesch, werd afgescheiden, vertoonde verschillend proteolytisch vermogen. In het broodsap werden buisjes van Mett het meest aangetast. Door toevoegen van HCl en water werden van alle drie soorten gelijke hoeveelheden gemaakt, die bij gelijk HClgehalte, wat de digestie betreft, aequivalente quantiteiten enzym bevatten. Van alle drie werd de stollingstijd bepaald, die in alle drie gevallen gelijk was. De stremmende werking was dus volkomen evenredig met de proteolyse.

In het maagsap, dat na toediening van verschillend voedsel in elk der achtereenvolgende uren afzonderlijk werd opgevangen, was het enzymgehalte niet gelijk; wel ging sterker proteolyse samen met krachtiger stremming. Werd maagsap bij zure reactie gedigereerd in de broedstoof, dan verminderde de werkzaamheid;

¹⁾ Ueber die ein und demselben Eiweissfermente zukommende proteolytische und Milch koagulierende Wirkung verschiedener Verdauungssäfte. Zeitschr. f. Physiol. chem. Bd. XLII, S. 415.

in het afnemen van beide functies was weer duidelijk parallelisme waar te nemen.

Dezelfde uitkomst werd verkregen, wanneer het sap telkens voor de vermenging met melk werd geneutraliseerd met bariumcarbonaat.

Bij neutralisatie met soda verdween de stremmende werking eerder dan de proteolyse. Werd zuur maagsap 5 minuten aan verschillende temperaturen van 15 tot 62° blootgesteld, dan namen beide werkingen weer evenredig met elkaar af.

Door toevoeging van verschillende stoffen als chloornatrium, natriumacetaat, natriumsalicylaat, aceton, alcohol, suiker, gal werd het parallelisme opgeheven en wel in dien zin, dat de digestie geschaad werd, de stremming niet; werd de verontreinigde oplossing echter met zoutzuur verdund en vergeleken met eene even sterk verdunde zuivere oplossing, dan werden de uitkomsten weer gelijk bevonden. Met de verminderde concentratie van de toegevoegde stof verdween haar storende invloed. Aan vernieling van pepsine kon hier dus niet gedacht worden.

Alkalien en alkalische zouten deden ook de lewerking afnemen, een vermindering der proteolyse ging daarmee evenwel samen.

Voor pancreassap en het secreet der pars pylorica van de maag en van de klieren van Brunner van het duodenum constateerden zij hetzelfde parallelisme.

In alle onderzochte enzymen vonden *Pawlow* en *Parastschuk* dus onder allerlei omstandigheden overeenkomst tusschen digereerende en stremmende werking.

Om eene verklaring te vinden voor de meening van andere schrijvers, dat leb en pepsine twee verschillende stoffen zijn, kritiseerden zij de door anderen gevolgde methoden van onderzoek.

In de eerste plaats bleek hun, dat de tijdwet zelfs bij neutralisatie met NaHCO_3 voor eenigszins verdunde oplossingen niet geldt. Een tweede belangrijke factor is de vernielende invloed van alkalien, waarmee gewoonlijk geneutraliseerd wordt; zelfs door zeer voorzichtig neutraliseeren met natriumcarbonaat wordt enzym vernield. Hierin zoeken zij vooral de verklaring van het door *Hammarsten* gevonden verschijnsel, dat leb door digestie met zoutzuur meer vernield wordt dan pepsine.

Voor de bepaling van proteolytische en stremmende werking werden niet even nauwkeurige methoden gevolgd. Fibrine is toch voor pepsine een reagens van bijna onbegrensde gevoeligheid, terwijl de neutrale leboplossing bij verdunning weldra de grens harer werkzaamheid bereikt; zij konden krachtig werkend broodsap verscheidene honderd malen en zelfs duizend maal verdunnen en toch in 1 á 2 uur vertering van fibrine waarnemen. Hetzelfde sap met NaHCO_3 geneutraliseerd en 10 tot 20 maal verdund, deed de melk eerst na vele uren stremmen en bij nog verder verdunnen in 't geheel niet meer. Ook werd door vele onderzoekers niet gelet op den digestiestorenden invloed van zouten, waardoor de stremming niet wordt gehinderd. Dit treedt vooral op den voorgrond bij verschillende lebpraeparaten uit den handel, en geeft, althans grootendeels, volgens *Pawlow* en *Parastschuk*, eene verklaring voor de bevindingen van *Glässner* ¹⁾, die gemeend heeft de zymogenen van pepsine en van chymosine van elkander te kunnen scheiden, door een extract van het maagslijmvlies, waarin beide zymogenen zijn opgelost, met uranylacetaat en natriumphosphaat te behandelen. Dat dan de van het gevormde

¹⁾ Hofm. Beiträge, Bd. I. S. 1.

uranylphosphaat afgefiltreerde vloeistof, nadat het enzym door zoutzuur vrijgemaakt was, wel de werking van chymosine, maar niet of nauwelijks die van pepsine vertoonde, kon immers toegeschreven worden aan het gehalte van de vloeistof aan natriumacetaat, waardoor de werking van pepsine wordt tegengegaan.

De juistheid van deze verklaring werd nader aangetoond door *Pekelharing*¹⁾, die de methode van *Glässner* volgde, alleen met deze wijziging, dat het filtraat van het uranylphosphaat eenigen tijd tegen verdund zoutzuur gedialyseerd werd; dan kwam de proteolytische werking even krachtig voor den dag als de stremmende.

Ook vond *Pekelharing*, in tegenstelling met *Glässner*, dat uit het pylorusgedeelte van het varkensmaagslijmvlies een enzymoplossing bereid kan worden, waarvan het stremmend vermogen parallel gaat met het proteolytische.

De methode van *Hammarsten* waarmede hij meende, door schudden met magnesiumcarbonaat, de pepsine met het praecipitaat te kunnen verwijderen, terwijl de leb in oplossing bleef, bleek ondoelmatig. Wel vonden ook *Pawlow* en *Parastchuk*, dat het filtraat sterke lebwerking bezat, en fibrine zelfs in 24 uur niet aantastte, maar als het met zuur 5 à 10 maal verdund werd, dan loste het fibrine duidelijk op. Proportionaliteit van beide werkingen was in het filtraat aanvankelijk niet te vinden, de pepsinewerking was veel zwakker dan de stremming. Werd echter het filtraat dat door schudden met magnesiumcarbonaat alkalisch was geworden niet dadelijk aangezuurd, maar eerst geneutraliseerd en na eenigen tijd op de gewenschte aciditeit gebracht, dan vonden zij dat de pepsine in minstens even sterke mate was

¹⁾ Arch. des Sciences biol. T. XI, Suppl. p. 36.

aan te toonen als de leb. Werd de alkalische vloeistof direct aangezuurd, dan werd ze troebel en ontstond er een neerslag, dat uitbleef als in 2 stadia werd aangezuurd, eerst tot neutrale reactie en daarna tot de bepaalde aciditeit. De pepsine-werking was des te sterker, hoe langer de neutrale reactie geduurd had.

Het door *Hammarsten* ingebrachte bezwaar, dat proteolytische en stremmende werking bij verdunning der oplossing niet dezelfde verhouding vertoonden tot de enzymconcentratie, meenden *Pawlow* en *Paraschuk* te kunnen weerleggen door hetgeen zij vonden, wanneer met de verdunning het zuur- resp. zoutgehalte verandering onderging. De werking van met NaHCO_3 geneutraliseerd maagsap was evenredig met de 1ste macht van de concentratie. Werd zuur maagsap in verschillende quantiteit aan dezelfde hoeveelheid melk toegevoegd, zoodat behalve het enzymgehalte ook dat van het zuur veranderde, dan vonden zij evenredigheid met het kwadraat van de enzymquantiteit: hetzelfde werd waargenomen bij neutralisatie met een zout dat de reactie bespoedigt, als bariumcarbonaat. Voegden zij verschillende, doch groote hoeveelheden eener sterk verdunde neutrale oplossing aan de melk toe, dan zagen zij vaak een derden regel; de tijden waren evenredig met den wortel der enzymconcentratie.

Op dezelfde wijze kan de regel voor de proteolyse veranderd worden. Bij verdunning van een niet al te sterk maagsap met water vonden zij dat het eiwit der buisjes van Mett evenredig met de eerste macht der concentratie werd aangetast.

De werkingswet is dus te zeer van omstandigheden afhankelijk om daaruit eenig bewijs te putten voor of tegen de eenheid van pepsine en leb.

Het voorkomen van lebwerking bij het proteolytisch

enzym van dieren en planten, die nooit melk als voedsel te verwerken hebben, laat zich volgens *Pawlow* zoo verklaren, dat de stremming van melk een bijkomende reactie van het pepsine-molecule is. Hij beschouwt de stremming evenals de vorming van plasteine, als eene omgekeerde, proteosynthetische werking van de pepsine.

*Sawjalow*¹⁾ kan in hoofdzaak met de opvatting van *Pawlow* meegaan. Hij meent echter, dat zijn eerste bewijs voor de eenheid der enzymen, de constante verhouding der pepsine en leb in het maagsap onder verschillende physiologische omstandigheden, ook verklaard kan worden uit de constante samenstelling van het protoplasmamolecule in de maagkliercel. Stelt men zich voor, dat dit m pepsine vormende groepen bevat en n chymosine vormende, dan zullen beide enzymen bij het uiteenvallen van het molecule vrij komen in de verhouding m:n.

Terwijl *Pawlow* bewees, dat de scheiding van leb en pepsine slechts schijnbaar gelukt, meent *Sawjalow* dat het tweede bezwaar tegen de eenheid, de verschillende regels, die de enzymen bij toenemende verdunning volgen, door *Pawlow*. niet voldoende is weerlegd.

Hij onderzocht daarom de werkingwet van pepsine en chymosine opnieuw en vond, dat het laatste in geconcentreerde oplossingen, zoodat de stollingstijd niet meer bedroeg dan 10 minuten, eene werking bezat, die evenredig was met de 1e macht van het enzymgehalte. Voor pepsine vond hij volgens de methode van Grützner met karmijnfibrine eveneens evenredigheid van de werking met de 1e macht der

1) Zur Frage nach der Identität von Pepsin und Chymosin. Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. XLVI, S. 307.

concentratie. Daaruit besluit hij, dat zij denzelfden regel volgen.

Wordt het eiwitsplitsend vermogen met behulp van eiwitbuisjes naar Mett bepaald, dan vindt men evenredigheid van de pepsineconcentratie met het kwadraat der afneming van het eiwitcilindertje. Dit feit werd door alle onderzoekers geconstateerd. *Sawjalow* verklaart dit niet als eene eigenaardigheid van de pepsine, maar als een gevolg van de inrichting der proeven. De digestie vindt plaats binnen de eiwitgel, en men mag aannemen, dat daar de concentratie van de pepsine eene andere is, als in de vloeistof. Om dit te onderzoeken nam hij in plaats van eiwit gelatine, die zich juist zoo gedraagt als eiwit, wanneer zij op dezelfde wijze in buisjes van Mett gebruikt wordt. Bij 40° werd een neutraal extract van varkensmaagslijmvliezen in verschillende verdunningen met gelatine gemengd en in buisjes gebracht. Na het vast worden der gelatine werden de buisjes in $\frac{1}{10}$ zoutzuur geworpen en bleven daarin bij kamertemperatuur 3—6 uur. De afneming der gelatinecilindertjes verhield zich nu als de 1e macht der concentratie. *Sawjalow* besluit daaruit, dat de zoogen. regel van Borissow niet de werkingswet van pepsine weergeeft, maar een uitdrukking is voor de verhouding van de pepsineconcentratie in de eiwitgel en in de oplossing, waarin het buisje ligt.

Dat chymosine bij neutrale reactie werkt is volgens *Sawjalow* slechts schijnbaar, omdat melk geen neutrale vloeistof is; er komen H-ionen in voor. Hij vond, dat een neutraal extract van varkensmagen in overeenstemming hiermee bij toevoegen van 0.5% monokaliumpfosfaat fibrine oploste en eiwitbuisjes aantastte, hoewel de vloeistof geen vrij zuur bevatte. Hij besluit tot het bestaan van één maagenzym dat

proteolytisch en stremmend werkt. Met *Pawlows* verklaring der lebwerking als een proteosynthetische reactie van de pepsine kan hij niet instemmen; hij neemt aan, dat deze opvatting voor de vorming van plasteine geldt, maar daar caseine geen digestieproduct is, maar een natief eiwit van hoog moleculair gewicht, meent hij dat zij hiervoor niet van toepassing is. Hij beschouwt de lebwerking als eene beginnende caseinedigestie, waarbij splitsing geschiedt in paracaseine een albumoseachtig eiwit. Dat de paracaseine met calcium wordt neergeslagen heeft met de enzymwerking niets uit te staan. Deze theorie wordt gesteund door het feit dat albumosen de lebwerking storen, wat moeilijk te verstaan zou zijn, als stremming het omgekeerde proces was van digestie, maar daarentegen zeer verklaarbaar wordt als men beide werkingen beschouwt als digestie.

Aan de methode van *Schrumpf*¹⁾ om de pepsine door neerslaan met in aether en alkohol opgeloste cholestherine af te zonderen kan men na hetgeen door *Pawlow* over de scheiding der enzymen werd medegedeeld, niet veel waarde hechten. Dikwijls werd het enzym door de behandeling geheel onwerkzaam en steeds verloor het, ook al vertoonde het aanvankelijk krachtige proteolyse, na 3- à 4 uur zijne werking. Men mag dus met groote zekerheid besluiten, dat de ondergane behandeling ten zeerste nadeelig was voor het enzym.

*Van der Leek*²⁾ gaat uit van de onderstelling, dat pepsine en chymosine, als zij identiek zijn in verschillende oplossingen, altijd in dezelfde verhouding moeten voorkomen. Hij neemt van twee handelsprae-

¹⁾ Darstellung des Pepsinfermentes aus Magenpresssaft. Hofm. Beitr. Bd. VI S. 396.

²⁾ Aromabildende Bacterien in Milch. Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Bd. VII. 2e Abt. S. 483.

paraten, leb en pepsine, gelijke hoeveelheden en vindt dat de leb melk in 25 maal korter tijd doet stremmen, dan de pepsine. Daarna bepaalt hij van beiden de proteolytische werking; deze is bij de pepsine ongeveer 50 maal sterker dan bij de leb. Na hetgeen door *Pawlow* en anderen over digestie storende stoffen in lebpraeparaten uit den handel is gezegd, behoeft het nauwelijks vermelding, dat deze proef niets bewijst. Dezelfde proef werd herhaald met hetzelfde resultaat, waarbij een eigen gemaakt enzympraeparaat uit kalfsmagen werd gebruikt.

Een kalfsmaag werd met 5% NaCl oplossing uitgetrokken en het enzym met keukenzout geprecipiteerd en weer opgelost in water. Deze vloeistof werkte zwak proteolytisch en sterk stremmend. Dezelfde maag werd met 2% zoutzuur voor den tweeden keer uitgetrokken. Dit extract werkte sterk proteolytisch en zwak coaguleerend. Ook deze vloeistoffen zijn niet vergelijkbaar, daar de eerste ongetwijfeld veel keukenzout bevatte. Ik vond, dat 0.14% NaCl de digestie van kippeneiwit tot op de helft verminderde.

Ernstiger bedenkingen tegen de eenheidstheorie werden geopperd door *Schmidt Nielsen*.¹⁾ Hij legt vooral nadruk op de ontdekking van *Hammarsten*, dat men eene oplossing van maagenzym door digereeren met zoutzuur chymosinevrij kan maken, zonder dat zij hare digereerende werking verliest. Dit geldt althans voor het enzym uit kalfsmagen. De mogelijkheid acht hij niet uitgesloten, dat hondenmaagsap, waar *Pawlow* mee werkte, in dezen van het kalfsmaagsap verschilt. Ook heeft hij het bezwaar tegen *Pawlow's* werk, dat het niet zeker is, of de door hem waargenomen stremming wel chymosine-

¹⁾ Ueber die vermeintliche Identität von Pepsin und Chymosin. Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. 48 S. 92.

werking is, daar hij zure enzymoplossingen gebruikte, terwijl *Hammarsten* reeds mededeelde, dat pepsine bij zure reactie onafhankelijk van de chymosine melk kan doen stremmen. In hoofdzaak komt het principe van *Schmidt Nielsen's* onderzoek hierop neer: hij liet een zuur kalfsmaaginfuus zoolang digereeren, totdat de melkstromming bij neutrale reactie een zeer langen tijd noodig had (4—6 uur) en verdunde dan eene geneutraliseerde hoeveelheid van hetzelfde niet gedigereerde maaginfuus zooveel met gedistilleerd water, dat ze bij neutrale reactie de melk in den zelfden tijd deed stremmen.

Beide oplossingen werden dan tot dezelfde aciditeit aangezuurd en de proteolyse met fibrinevlokken bepaald. Ook onderzocht hij de stremmende werking van beide vloeistoffen bij zure reactie, waartoe hij het zuur aan de melk toevoegde en daarna de aangezuurde melk met eene afgemeten hoeveelheid neutrale enzymoplossing vermengde. De uitkomsten leerden, dat de fibrinedigestie en de zure melkstromming bij de gedigereerde oplossing veel minder tijd behoeften dan bij de verdunde, terwijl de stremming bij neutrale reactie door beide in bijna denzelfden tijd geschiedde. *Schmidt Nielsen* besluit daaruit, dat leb en pepsine onmogelijk dezelfde stof kunnen zijn. Bij mijn eigen onderzoek heb ik deze kwestie nog eens nagegaan. Ik kom daarop later terug.

E. Fuld ¹⁾ kon de waarneming van *Hammarsten*, dat chymosine door 48 uur digereeren met zoutzuur vernield wordt, niet bevestigen; hij bereikte dit zelfs na dagen niet. Niettemin is hij een tegenstander van de eenheidstheorie. „Sind die Zeiten noch nicht lange, resp. nicht ganz vorüber, wo man in Lab und Pepsin

1) Ueber Milchgerinnung durch Lab. Ergebnisse der Physiologie, 1^e Jahrgang, 1^e Abt. S. 479 und 472.

ein und dasselbe Molecule sehen wollte" zoo drukt hij zich uit. In eene latere mededeeling ¹⁾ over „Molken albumose", nadat hij heeft kennis genomen van de onderzoekingen van *Spiro* en *Petry* over de splitsende werking van leb op caseine, schijnt het, dat deze overtuiging niet zoo vast meer staat en meent hij, dat de zelfstandigheid van leb tegenover pepsine opnieuw bewezen dient te worden.

Terwijl men het er wel algemeen over eens is, dat de werking van pepsine op eiwit bestaat in eene hydrolytische splitsing, is er langen tijd oneenigheid geweest over het wezen der lebwerking.

Hammarsten ²⁾ meende, dat er bij de stremming splitsing van caseine plaats vond; het eene splitsingsproduct, de paracaseine, zou door binding met calcium het kaasneerslag, vormen het andere zou als peptonachtige stof in oplossing blijven. Hij verklaart echter niet, waarom niet van het oogenblik af, dat de leb wordt toegevoegd, kaas begint neer te slaan. De omzetting der caseine begint wel dadelijk; dit kon *Fuld* ³⁾ bewijzen door aan een mengsel van melk en enzymoplossing na eenigen tijd digereeren eene nieuwe hoeveelheid melk of enzym toe te voegen. Uit de verlenging resp. verkorting der stremmingstijden kon dan berekend worden hoeveel caseine op het moment der tweede enzymtoevoeging reeds in paracaseine veranderd was. Het bleek dat de omzetting met constante snelheid plaats heeft. Dat het enzym bij de overdraging van calcium aan de paracaseine geen werkzaam aandeel

¹⁾ Ueber Molkenalbumose. Biochemische Zeitschrift, Bd. IV. S. 491.

²⁾ Nova Acta reg. societatis Scientiar. Upsaliensis 1877. S. 45.

³⁾ Ueber die Milchgerinnung durch Lab. Hofm. Beiträge, Bd. II. S. 178, 177.

heeft, zooals de *Jager*¹⁾ wil, kon *Fuld* aantoonen door calciumvrije caseïne oplossingen met leb te digereeren, en daarna CaCl_2 , toe te voegen. De praecipitatie geschiedde dan zeer snel en in gelijken tijd, onafhankelijk van de hoeveelheid leb. Hij schrijft het plotseling neerslaan daaraan toe, dat caseïne de kaas in oplossing houdt; is het caseïnegehalte tot een zekeren graad gedaald, dan geschiedt de praecipitatie.

Reichel en *Spiro*²⁾ namen eene specifieke digereerende werking van leb op caseïne waar. Door eene calciumvrije caseïneoplossing met leb te digereeren konden zij aantoonen, dat daarbij albumose ontstaat.

*Petry*³⁾ meent, dat de stremming van caseïne niet berust op eene splitsing in paracaseïne en weieiwit. Hij beschouwt het ontstaan van weieiwit als de werking van een afzonderlijk in leb voorkomend splitsend enzym, dat met de stremming niets heeft uit te staan.

Werd een kalkvrije caseïne-oplossing langen tijd met leb gedigereerd, dan kon hij door toevoegen van CaCl_2 geen neerslag meer krijgen; dit wijst op eene verandering der caseïne, die verder gaat dan paracaseïnevorming. Door op verschillende tijden een proef van de digereerende oplossing te nemen en daaruit de gevormde paracaseïne door verzadigen met magnesiumsulfaat te verwijderen, kon hij aantoonen, dat in het filtraat de hoeveelheid in oplossing blijvende stikstof bij langer digestie vermeerderde. De vorming van weieiwit hield dus bij het ontstaan van paraca-

¹⁾ Over de werking van lebferment. Weekblad v. h. Nederl. Tijdschr. v. Geneeskunde, 1897, pag. 262.

²⁾ Beeinflussung und Natur des Labungsvorganges. Hofm. Beiträge, Bd. VIII, S. 367.

³⁾ Ueber die Einwirkung des Labferments auf Kasein. Hofm. Beiträge, Bd. VIII, S. 339.

seine niet op, maar schreed steeds verder. Ook met azijnzuur ontstond er in de gedigereerde oplossing een neerslag, werd dit afgefiltreerd, dan kon hij door half verzadigen met ammoniumsulfaat in het filtraat een neerslag verkrijgen, dat veel overeenkomst bezat met de primaire albumosen der proteolytische enzymen; werd dit afgefiltreerd, dan ontstond door geheel verzadigen weer een neerslag, dat met secundaire albumosen overeenkwam. Het lebezym is dus in staat eene diepgaande splitsing van het caseine-molecule te weeg te brengen. De werking verschilt in zooverre van die der bekende proteolytische fermenten, dat zij bij neutrale reactie en lage temperatuur plaats vindt. Werd van twee verschillend sterke leboplossingen de splitsende werking nagegaan door bepaling van de hoeveelheid stikstof, die na half verzadigen met zinksulfaat in oplossing bleef, dan vond hij eene verhouding van concentratie en werking naar de regel van Schütz—Borissow.

Er bestond dus een zekere overeenkomst met pepsinewerking, waarom *Petry* dacht aan de mogelijkheid, dat de leb met pepsine verontreinigd was. Hij onderzocht dus of andere eiwitten er ook door werden aangetast. Bij neutrale reactie werden noch kippeneiwit noch serumalbumine gedigereerd; bij zure reactie werd serumalbumine wel aangetast, het andere niet. De digestie van het serumeiwit was echter zoo gering, dat het pepsinegehalte in geen geval hoog kon zijn.

Hij nam nu eene zure pepsine-oplossing, die door 8 dagen digereeren niet meer in staat was een tienvoudig volume melk in 12 uur te doen stremmen, en verdunde deze zooveel met zoutzuur, dat de digestie der serumalbumine buisjes twee maal zoo groot was als van de leboplossing. Werd deze oplossing geneutraliseerd en met caseineoplossing gedigereerd, dan kon

hij geen splitsing van caseïne constateeren. Daaruit besluit hij dat ook in de leëoplossing de splitsende werking niet aan verontreiniging met pepsine kan worden toegeschreven. Ook meent hij daarmee de bewering weerlegd te hebben, dat caseïne tegenover proteolytische enzymen minder resistent is en daarom door pepsine onder omstandigheden, waarin andere eiwitten onaangetast blijven, wel wordt gedigereerd. *Petry* onderstelt daarom in zijn leë een ander proteolytisch enzym, dat alleen op caseïne werkt, ook bij lage temperatuur en neutrale reactie.

Dit besluit is naar mijne meening niet te rechtvaardigen. *Petry* gebruikte een leëpraeparaat van Merck. Hij maakt nu nergens gewag van de mogelijkheid, dat dit praeparaat, evenals voor zoovele andere door verschillende onderzoekers werd aangetoond, tevens pepsine werking bezit, mits het slechts door geschikte bewerking geactiveerd wordt. Dat hij dit over 't hoofd zag en daarom eerst dacht aan verontreiniging met pepsine moet wel worden toegeschreven aan zijne vaste overtuiging van de tweeheid van leë en pepsine. Hij vond, dat zijn leëpraeparaat in staat was bij neutrale reactie eene vergaande splitsing van caseïne te weeg te brengen en bij zure reactie serum albumine op te lossen. Op de andere onderzochte eiwitten was geen proteolytische werking waar te nemen. Of deze werking door digestie storende stoffen werd verhinderd en of de stoornis opgeheven kon worden, werd niet beproefd. In merkwaardige overeenstemming hiermee is het door *O. Schwarz*¹⁾ gevonden onderscheid tusschen kippeneiwit en serumalbumine. Voegde hij aan eene pepsineoplossing antipepsine toe, dan werd de digestie van kippeneiwit gestoord, die van serum-

¹⁾ Zur Kenntniss der Antipepsine. Hofm. Beiträge, Bd. VI. S. 531.

eiwit niet. Dit geschiedde eerst door toevoeging van veel meer antipepsine.

In verband hiermee schijnt het mij toe, dat men bij de verschillende splitsende werking van Petry's lebpraeparaat tegenover caseïne, serumeiwit en andere eiwitten eerder heeft te denken aan een verschil der eiwitten, dan aan een onderscheid in de enzymen.

Men kan zich toch zeer goed voorstellen, dat de leboplossing, waarin het proteolytisch agens door bijmengselen verhinderd wordt andere eiwitten aan te tasten, nog wel in staat is caseïne bij neutrale reactie te splitsen en serumalbumine bij zure reactie op te lossen. De proef van *Petry* met gedigereerde pepsine oplossing is hiermee evenmin in tegenspraak, als zij voor zijn doel bewijzend is. Het feit, dat pepsine-oplossingen, die bij neutrale reactie melk doen stremmen, dit vermogen door digestie met zoutzuur verliezen, kan niet ontkend worden. Alleen over de verklaring heerscht verschil van meening. Terwijl de oorspronkelijke meening was, dat het lebezym vernield werd (*Hammarsten*), meenen anderen, dat in het neutraliseeren de oorzaak der onwerkzaamheid moet gezocht worden (*Pawlow*). *Petry* gebruikte eene gedigereerde oplossing van pepsine, die bij neutrale reactie melk niet meer deed stremmen in 12 uur, maar bij zure reactie nog wel serumalbumine oploste. De inactiviteit tegenover caseïne bij neutrale reactie kan dus verklaard worden, doordat het enzym na de digestie door *neutraliseeren* onwerkzaam wordt.

Petry heeft dus niet bewezen, dat niet gedigereerde pepsine bij neutrale reactie geen caseïne splitst. Stelt men zich op het standpunt van hen, die meenen, dat pepsine en leb één stof zijn, dan kan men de stremming van caseïne aldus verklaren. Het enzym (pepsineleb) brengt bij neutrale reactie eene splitsing der

caseine tot stand. Zoodra het grootste deel der caseine in paracaseine is overgegaan, is volgens *Fuld* de eerste bij aanwezigheid van calciumzouten niet in staat de tweede in oplossing te houden; de calciumverbinding der paracaseine slaat neer, waarop het enzym volgens *Petry* bij neutrale reactie niet verder werkt. Bij afwezigheid van kalkzouten heeft de praecipitatie niet plaats, maar zet het enzym zijne splitsende werking op de paracaseine voort.

Volgens *Petry* berust de stremming niet op splitsing der caseine in paracaseine en weieiwit; dan toch, meent hij, zou men bij de stremming van gelijke hoeveelheden melk door verschillende quantiteiten leeb evenveel weieiwit moeten vinden. Hij vergeleek de hoeveelheid weieiwit die ontstond bij de stremming van twee even groote proeven melk, waarvan de eene voorzien was van eene sterke, de andere van eene 200 maal verdunde leeboplossing, en vond in de proef met verdunde leeb meer weieiwit dan in de andere. Dat laat zich wel verklaren. *Petry* vond, dat de caseinesplitsing plaats heeft volgens de regel van Schutz—Borissow. De 200 maal verdunde oplossing heeft dus voor de vorming van evenveel weieiwit $\sqrt{200}$ maal zooveel tijd noodig als de sterke oplossing. De proef met de verdunde oplossing duurde ruim 200 maal zoo lang als de andere en moest derhalve ook meer weieiwit bevatten. Een deel van de paracaseine, dat in 't begin der proef uit de caseine was afgesplitst zal daarbij eene verdere ontleding hebben ondergaan en waarschijnlijk in 't geheel niet meer zijn neergeslagen. Het is toch niet waarschijnlijk, dat eerst alle caseine in paracaseine moet zijn omgezet, voordat de laatste eene verdere splitsing ondergaat, vooral omdat *Fuld* bewees, dat de omzetting met constante snelheid plaats heeft.

Nog op andere wijze trachtte hij te bewijzen, dat het caseinesplitsend enzym der leb een ander is, als het stremmende.

Eene leboplossing werd deels door digereeren met natriumcarbonaat verzwakt, en deels zoo veel verdund, dat beide oplossingen in denzelfden tijd melk deden stremmen. Dan werd uit melk een calciumvrije caseine-oplossing bereid, en het caseine-splitsend vermogen hierop onderzocht. De met Na_2CO_3 behandelde leb splitste minder caseine, dan de verdunde, en na lange digestie met Na_2CO_3 was in 't geheel geen splitsing waar te nemen. Dit pleit nu tegen de verklaring der stremming als splitsingsproces, maar bewijzend is het niet, daar niet werd beproefd, of de calciumvrije caseineoplossing na de digestie met verzwakte leb door toevoegen van calcium tot stolling was te brengen. Het is toch mogelijk, dat de mishandelde leb nog wel in staat was in melk caseine splitsing en daardoor stremming te weeg te brengen, maar niet in eene vloeistof, waarin de kunstmatig afgescheiden caseine was opgelost. De bezwaren, door *Petry* ingebracht tegen de opvatting, dat de stremmende werking van leb op caseine berust op splitsing, wegen dus niet zwaar.

*Fuld*¹⁾ constateerde eveneens, dat leb in staat is de caseine te splitsen en *M. van Herwerden*²⁾ toonde aan dat daarbij splitsingsproducten ontstaan, die door verschillende reacties zijn te onderscheiden.

Na al wat in den lateren tijd hierover bekend is geworden mag men wel besluiten, dat stremming van caseine eene reactie is, die niet zoo heel veel verschilt

¹⁾ Ueber die Molkenalbumose Biochem. Zeitschr. Bd. IV. S. 488

²⁾ Beitrag zur Kenntniss der Labwirkung auf Casein. Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. LII. S. 184.

van de oplossing van eiwit door pepsine. De opvatting van *Sawjalow*, dat stremming een begin van digestie is, waarbij een der eerst ontstaande digestie producten zich met calcium verbindt tot eene onoplosbare stof, heeft dus zeer aan waarschijnlijkheid gewonnen. Men heeft dan alleen aan te nemen, dat caseïne zich in zooverre van de andere eiwitstoffen onderscheidt, dat het door leb, waarin de pepsine voor andere eiwitten inactief is, wel wordt gesplitst en dat voor deze werking zure reactie en hogere temperatuur geen vereischten zijn. Dat leb ook voor kippeneiwit bij neutrale reactie niet geheel inactief is, toonde *M. van Herwerden* aan met een handelspraeparaat van Van Hasselt en dat zij bij zure reactie wel serumeiwit aantast werd door *Petry* waargenomen.

Het bezwaar, dat door *Schmidt Nielsen* tegen de eenheid der enzymen werd ingebracht zal ik in een later hoofdstuk uitvoeriger behandelen.

Voor de bepaling der hoeveelheid leb, die eene oplossing bevat wordt gewoonlijk aangenomen, dat de concentratie der oplossing omgekeerd evenredig is met den tijd, die voor de stremming noodig is.

Voor het enzym der kalfsmagen werd deze wet door de meeste onderzoekers juist bevonden, althans binnen zekere grenzen.

*Fuld*¹⁾ kon met de methode van Morgenroth zoowel voor zeer zwakke als voor zeer sterke concentratie geldigheid der wet constateeren. *Lörcher*²⁾ vond, dat bij toenemende concentratie de snelheid der werking steeds minder toenam. *Pawlow* kon voor hondenmaagsap, als het eenigszins verdund werd, geen evenredigheid tusschen hoeveelheid leb en werking meer

¹⁾ Ueber Milchgerinnung durch Lab. Hofm. Beiträge. Bd. II. S. 169.

²⁾ Ueber Labwirkung. Pflüger's Archiv. Bd. LXIX. S. 179.

waarnemen. Volgens *Becker* ¹⁾ gaat de wet voor menschelijk maagsap niet op. *Bang* ²⁾ meent, dat het enzym van varkens en eenige andere dieren zich in dezen anders gedraagt, dan dat van het kalf.

Daar hij ook in andere opzichten verschil tusschen deze beide enzymsoorten vond, neemt hij aan, dat het stremmend enzym van 't varken evenals dat uit pepsine praeparaten een andere stof is, als de kalfsleb en de leb uit den handel.

Op deze kwestie zal ik hier niet verder ingaan; bij de beschrijving mijner proeven kom ik er nader op terug.

Bereiding van het Enzym.

Niet alle onderzoekers werkten met gelijke praeparaten. De een gebruikte bereidingen uit den handel, de ander oplossingen, die door extractie of andere bewerking uit magen van verschillende dieren verkregen werden. Door *Bang* ³⁾ en anderen werd reeds de opmerking gemaakt, dat men bij de studie der enzymen wel heeft te onderscheiden van welke diersoort zij afkomstig zijn, maar van niet minder belang is de bereidingswijze. Veel hangt af van den graad van reinheid en den aard van eventueel aanwezige veront-

¹⁾ Untersuchungen über das Zeitgesetz. des menschlichen Labfermentes und dessen quantitative Bestimmung. Hofm. Beiträge. Bd. VII. S. 89.

²⁾ Ueber Parachymosin ein neues Labferment. Pflügers Archiv. Bd. LXXIX. S. 425.

³⁾ Sind die proteolytischen und milchcoagulirenden Fermentwirkungen verschiedene Eigenschaften eines und desselben Fermentes. Zeitschr. f. Physiol. chem. Bd. XLIII, S. 358.

reinigende stoffen. Daarom meen ik, dat een eenigszins nauwkeurige beschrijving van de gevolgde methode van bereiding en de pogingen om onzuiverheden te elimineeren hier niet achterwege mag blijven.

Zuiver enzym is zeker het best te verkrijgen van honden met een maagfistel, vooral, wanneer deze communiceert met een afzonderlijke bijmaag. Verontreiniging is dan vrijwel uitgesloten, behalve met wat slijm, dat bovendien gemakkelijk verwijderd kan worden. Daarbij is men er zeker van, het maagenzym in zijn meest natuurlijken vorm te verkrijgen. Deze methode brengt evenwel niet geringe bezwaren mee en voor de keuze van het proefdier is men haast beperkt tot den hond. Daarbij doet zich dan weer de moeilijkheid voor, dat het maagsap van den hond in vergelijking met dat van andere dieren volgens sommigen een aparte plaats inneemt. Daar nu mijn onderzoek in hoofdzaak gericht was op de chymosine-parachymosine en de chymosine-pepsine kwestie, scheen het beter gebruik te maken van kalfs- en varkensenzym. Ik moest dus eene andere bereidingswijze kiezen. Daarom maakte ik gebruik van de methode door *Pekelharing* meegedeeld en beschreven in Hoppe Seyler's Zeitschrift Bd. 22 welke methode ik hier in 't kort zal herhalen.

Van 10 varkensmagen wordt de mucosa van het fundusgedeelte afgepraepareerd, goed fijngehakt en gebracht in een flesch met 6 L 0,5% HCl. De flesch wordt in een bak met water gezet, dat op een constante temperatuur van 37° wordt gehouden. In de meeste gevallen werd de vloeistof zoo gedurende 2 dagen gedigereerd, soms ook langer. Na afloop der digestie wordt de troebele vloeistof door zuigfilters, waarin zich samengeperste pap van filtreerpapier bevindt, gefiltreerd. Er wordt een helder geel gekleurd

filtraat verkregen, dat in perkament dialysators in een grooten bak met stroomend water gehangen wordt. De dialyse werd gewoonlijk 24 uur voortgezet. Dan is de vloeistof troebel geworden. Door centrifugeeren kan er een neerslag uit afgescheiden worden, dat in 0,2% HCl bij eene temperatuur van 37° na eenigen tijd voor het grootste deel oplost. De vloeistof wordt dan door een verwarmd filter in de stoof bij 37° gefiltreerd. Men verkrijgt dan een helder, lichtgeel filtraat, dat bij afkoelen troebel wordt, als althans voor het oplossen van het praecipitaat uit de centrifuge niet te veel HCl werd gebruikt. Dit filtraat wordt weer in een dialysator gebracht en 24 uur gedialyseerd tegen gedistilleerd water; er is dan weer een neerslag ontstaan, dat afgefiltreerd wordt. Het filter wordt tusschen filtreerpapier uitgeperst, het neerslag er afgenomen, opgelost in 0,2% HCl van 37° en bij eene temperatuur van 37° gefiltreerd. Men verkrijgt dan een filtraat, dat zeer sterke enzymwerking bezit en als vrij zuiver mag worden beschouwd. De reiniging kan dan nog worden voortgezet door herhaald dialyseeren tegen gedistilleerd water en weer oplossen in zoutzuur. Wegens het belangrijk verlies, dat daarmee gepaard gaat, heb ik dit gewoonlijk niet gedaan.

De vloeistof, die men bij het centrifugeeren van het gedialyseerde filtraat der mucosae overhoudt, bevat nog veel enzym, dat door basisch loodacetaat en ammoniak wordt neergeslagen. Er ontstaat een volumineus vlokkig praecipitaat in eene heldere kleurlooze vloeistof. Het neerslag wordt op eenige filters afgefiltreerd, tusschen filtreerpapier zacht uitgeperst, van de filters genomen en met zooveel oxaalzuur in kristalvorm vermengd, als noodig is om al het aanwezige lood te binden. Na eenigen tijd staan bij een temperatuur van 30° ziet men het lood-

oxalaat als een wit poeder bezinken. Door middel van een zuigfilter is het gemakkelijk te verwijderen en men houdt een helderbruine vloeistof over, waarin na 24 uren dialyseeren tegen stroomend water weer een neerslag ontstaat, dat door centrifugeeren afgescheiden wordt, opgelost in 0,2% HCl bij 37° en verder behandeld als het eerste door dialyse uit het filtraat der mucosae verkregen neerslag. In de vloeistof, die na het centrifugeeren van de met oxaalzuur behandelde en gedialyseerde vloeistof afgegoten wordt kan door verzadigen met ammoniumsulfaat het hierin nog aanwezige enzym worden neergeslagen. Men filtreert het neerslag af, drukt het filter weer zacht uit tusschen filtreerpapier, neemt het praecipitaat er af, en brengt het in een dialysator, die in stroomend water wordt gehangen. In 24 uur is alles in het naar binnen gedialyseerde water opgelost en een groot deel van het $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ verdwenen. De dialysator wordt nu in een glas met 0,2% HCl gehangen, na 24 uur wordt de inhoud er uitgegoten, tot 37° verwarmd en bij dezelfde temperatuur gefiltreerd. Het filtraat wordt weer gedialyseerd tegen gedistilleerd water; er ontstaat een praecipitaat, dat afgefiltreerd wordt, opgelost in 0,2% HCl en bij 37° nogmaals gefiltreerd en men heeft eene derde hoeveelheid sterk werkende enzymoplossing.

Aangezien de bereide oplossingen gewoonlijk dadelijk in bewerking genomen werden, heb ik het enzym niet gedroogd en in poedervorm gebracht. Het is mij overigens herhaaldelijk gebleken, dat eene dergelijke oplossing in 0.2% HCl zoo noodig weken lang op eene koele plaats bewaard kan worden, zonder aan stremmend en digereerend vermogen noemenswaardige verliezen te lijden.

De beschreven bereidingswijze biedt bij het varkens-

enzym geen moeilijkheden. Men verkrijgt bij de dialyse een neerslag, dat in 0.2% HCl bij 37° gemakkelijk oplost en door filtreeren door een verwarmd filter gereinigd kan worden van een klein blijvend neerslag van onoplosbare bijmengselen. In het heldere filtraat heeft men dan een oplossing van zeer weinig verontreinigd enzym, zooals na de analyses, door *Pekelharing* verricht, wel mag worden aangenomen.

Anders is het bij de bereiding van het enzym uit kalfsmagen. Hier heeft men voortdurend te kampen met een slijmerige stof, die bij dialyse met het enzym neerslaat en in zoutzuur bij 37° gedeeltelijk weer oplost. Zij bemoeilijkt het filtreeren in hooge mate en maakt het soms geheel onmogelijk. Ook gaat zij voor een deel over in het filtraat, dat dan ook bijna nooit dadelijk als een heldere vloeistof te verkrijgen is. Door eenigszins van de gewone wijze van doen af te wijken, gelukte het meestal wel, ofschoon niet altijd, een helder filtraat te krijgen. Ik bracht daartoe het neerslag uit de dialysators in een niet al te groote hoeveelheid 0,2% zoutzuur. Door flink omroeren ging het over in een dunne slijmige vloeistof, die een uur lang in de broedstoof op een temperatuur van 37° werd gehouden en van tijd tot tijd nogmaals omgeroerd, daar er zich telkens weer een bezinksel in afscheidde. Daarna werd de vloeistof afgekoeld en bleef ongeveer 24 uur bij lage temperatuur staan. Ze was dan vrijwel helder geworden, terwijl op den bodem een neerslag was afgezet, waarvan de bovenste laag veel lichter gekleurd was, dan de onderste.

Werd nu opnieuw verwarmd tot 37° dan loste de lichter gekleurde laag op, en zoo niet geheel, dan was ze door toevoegen van meer zoutzuur gemakkelijk geheel in oplossing te brengen.

De onderste laag loste zoo goed als niet op, en bleef

als een draderige massa achter, die nu door filtreeren verwijderd kon worden.

Bij dialyse van het filtraat sloeg het enzym dan weer neer als een slijmige stof, die aan de dialysator vastkleefde, zoodat deze meestal opengeknipt moest worden om alles goed te kunnen verwijderen. Dit praecipitaat loste dan in zoutzuur gemakkelijk op.

Men mag dus niet verwachten, dat het enzym hier in even zuiveren toestand afgescheiden was als uit de varkensmagen, waar het als een fijn korrelig praecipitaat in den dialysator aanwezig is. De gelijke aard van de stof, die uit het eerste neerslag als verontreiniging kan worden afgescheiden, maakt het waarschijnlijk, dat ook het slijmige karakter van het gezuiverde enzym niet is te beschouwen als een eigenaardigheid van het kalfsenzym, maar is toe te schrijven aan een niet te verwijderen bijmengsel. Uit de vloeistof, die door centrifugeeren van het met oxaalzuur behandelde en door dialyse neergeslagen enzym werd afgescheiden, kon ik met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ geen bruikbare hoeveelheid enzym meer afzonderen. Het praecipiteeren geschiedde veel minder gemakkelijk, dan bij het varkensenzym en het groote praecipitaat, dat ten slotte ontstond, liet zich moeilijk affiltreeren; in den dialysator gebracht trok het zooveel water tot zich, dat het bijna nooit gelukte uit deze verdunde oplossing na dialyse tegen zoutzuur en tegen gedistilleerd water een neerslag te verzamelen.

Het gevonden verschil tusschen kalfs- en varkensenzymbereiding scheen mij niet zonder belang voor de verdere vergelijking dezer beide stoffen.

Bang, die zich met dit onderwerp het meest bezighield, gebruikte extracten uit maagslijmvliesen. De overweging, dat de slijmachtige stof misschien niet aanwezig zou zijn in enzymoplossingen, die door uit-

trekken met zoutzuur bij kamertemperatuur bereid waren, bracht mij er toe ook deze methode te beproeven.

Ik liet fijngehakte kalfsmaagmucosae uittrekken met 0,4 % HCl.; na eenige uren had ik een zeer werkzame oplossing verkregen, die door een zuigfilter gefiltreerd werd. Het heldere filtraat werd gedialyseerd tegen stroomend water en vertoonde na 24 uur een vrij groot neerslag van dezelfde slijmerige consistentie als het andere praeparaat. Opgelost in 0,2 % HCl. bij 37° gefiltreerd en opnieuw gedialyseerd tegen gedistilleerd water sloeg het weer neer zonder van aard te zijn veranderd. Er is dus geen reden om aan te nemen, dat de koud bereide extracten in dit opzicht van de andere oplossing verschillen.

Verder heb ik enzymoplossingen onderzocht, die gemaakt waren door uitpersen van maagmucosae om te zien of op deze wijze misschien gemakkelijker een bruikbaar praeparaat was te verkrijgen.

320 Gram fijngehakte maagslijmvliezen van het kalf werd met infusorien aarde en zand in een mortier fijngevreven, met 160 cm³. 0,2 % HCl vermengd en in een hydraulische pers bij een druk van 250 atm. uitgeperst. Het sap werd gefiltreerd; het heldere filtraat bedroeg 240 cm³. met een aciditeit van 0,058 % HCl.

Deze vloeistof bezat een krachtig stremmend vermogen, maar eiwit werd er bijna niet door aangetast. Er kon hier dus gedacht worden aan de mogelijkheid dat alleen leb, geen pepsine in het perssap was overgegaan; het was dan te verwachten, dat deze in de met zand gemengde tot een koek saamgeperste mucosaresten was achtergebleven. Daarom werd deze koek in 0,5 % HCl fijngeroerd en 3 dagen gedigereerd. Er werd een helder filtraat uit verkregen, dat echter

slechts zeer geringe proteolytische en stremmende werking bezat. Er bleef dus niet anders over, dan dat de pepsine wel degelijk in het perssap opgelost was, maar door een of ander agens onwerkzaam gemaakt werd. Dat de pepsine als proenzym aanwezig zou zijn was niet heel waarschijnlijk en werd door een nieuwe proef, waarbij 0,5 % HCl gebruikt werd, weerlegd. Waarschijnlijk bevatte het perssap dus antipepsine. Uit een nader onderzoek zal blijken, dat dit inderdaad de oorzaak was van de geringe digestie. In het enzym dat op de gewone wijze door digestie der slijmvliezen werd gewonnen, heb ik van anti-peptische werking nooit iets waargenomen. Misschien blijft deze stof, die door het kneuzen der weefsels met zand schijnt vrij te komen, bij digestie in de mucosaresten achter; nog aannemelijker is, dat zij door de digestie wordt vernield.

Een voor het doel bruikbaar enzym was echter op deze wijze niet te verkrijgen, waarom ik deze methode ook niet verder heb toegepast.

Met handelspraeparaten heb ik niet veel gewerkt.

De meeste lebpraeparaten digereeren bij zure reactie geen eiwit en toch is het niet moeilijk daaruit eene werkzame pepsineoplossing te maken.

De onbekendheid met de stoffen, die ter conserveering zijn toegevoegd en de onzekerheid ze volkomen te kunnen verwijderen maken deze bereidingen voor proefneming minder geschikt.

Inrichting der proeven en Betrouwbaarheid der Uitkomsten.

Daar zelfs sporen van enzym, die aan het vaatwerk blijven kleven, de juistheid der uitkomsten zeer kunnen benadeelen, is reinheid in alle opzichten een eerste vereischte. Voor de bepaling der digestie werd gebruik gemaakt van buisjes, met kippeneiwit gevuld, volgens de methode van Mett. De buisjes werden bewaard in een goed gesloten fleschje met 0,2% zoutzuur, waaraan een kristalletje thymol was toegevoegd. Voor het gebruik werden zij steeds met een pincet, dat te voren even gegloeid was, uit het fleschje genomen.

De glazen doosjes, waarin de digestie plaats had werden met warm zeepwater uitgewasschen en daarna in eene sterke oplossing van kaliloog gelegd; voor het gebruik goed uitgespoeld met water en daarna met 0,2% HCl en afgedroogd met een schoone doek. De enzymoplossingen, waarvan het proteolytisch vermogen bepaald moest worden, werden in de gewenschte verdunning afgemeten met een pipet, waarop tiende deelen van een cm^3 nauwkeurig waren af te lezen. Steeds werd voor een proef 10 cm^3 vloeistof gebruikt, waarin 2 buisjes gelegd werden. Daarbij werd zorg gedragen, dat de buisjes midden in de vloeistof lagen. De digestie had gewoonlijk plaats bij een HCl gehalte van 0,2% in een broedstoof bij een temperatuur van 37°.

De duur der proef was gewoonlijk 5 uur; slechts wanneer met zeer zwakke oplossingen gewerkt werd, werd de digestie langer voortgezet. De verkorting van het eiwitkolommetje werd onder het mikroskoop met

behulp van een oculairmikrometer, die in 50 deelstrepen, die elk met $\frac{1}{30}$ m.M. van het te meten voorwerp overeenkwamen, verdeeld was, gemeten.

Gewoonlijk kon de meting op deze wijze vrij nauwkeurig geschieden; slechts enkele malen werd door een schuin beloop of door onduidelijkheid der eiwitgrens de bepaling wat bemoeilijkt. Wanneer het glazen buisje niet recht was afgebroken werden fouten zooveel mogelijk vermeden door het buisje zoo te leggen, dat de grens van onder- en bovenkant elkaar bedekten.

Volgens den regel van Schütz-Borissow verkrijgt men door van de gevonden getallen het kwadraat te nemen eene uitdrukking voor de verhouding der enzymconcentratie in de gebruikte oplossingen.

Deze regel gaat op, mits de enzymwerking niet te zwak en niet te sterk is. Is zij te zwak, dan komen kleine fouten, voortspruitend uit het niet volkomen nauwkeurig afsnijden der eiwitkolommetjes te veel in aanmerking, terwijl ook onnauwkeurigheden in het meten zich meer doen gelden; is de verkorting van het eiwit-cylindertje zeer groot, dan is de toegankelijkheid tot het eiwit voor het enzym bemoeilijkt en inderdaad vindt men in die gevallen te lage uitkomsten. Zooals ik hierboven reeds vermeldde zou de regel van Schütz-Borissow volgens *Sawjalow* niet zijn een directe uitdrukking voor de intensiteit der pepsinewerking op het eiwit, maar aangeven de verhouding van de enzymconcentratie binnen het buisje ten opzichte van de concentratie der vloeistof, waarin de buisjes liggen. Als men bijv. de enzymconcentratie op 1 m.m. afstand van het uiteinde van een buisje, dat in eene oplossing ligt, gelijk 1 stelt, dan zou de enzymconcentratie op hetzelfde punt in een buisje, dat in een 4 maal sterkere oplossing ligt, gelijk 2 moeten zijn. Daarbij zou dan de intensiteit der directe

pepsinewerking op het eiwit evenredig zijn met de 1^e macht der concentratie.

Hoe dit zij, de hoofdzak is of men dezen regel mag aannemen als een maat voor de bepaling van het pepsinegehalte of niet.

De meeste onderzoekers geven op deze vraag een bevestigend antwoord en voor zoover ik heb nagegaan mag men inderdaad aannemen, dat de concentratie evenredig is met het kwadraat van de verkorting, evenwel met de beperking, dat de werking niet al te sterk en niet al te zwak moet zijn. Dit kwam o.a. duidelijk uit in eenige proeven, met hondemaagsap, waar dus van storende bijmengselen niet veel sprake kan zijn. Een proef werd genomen met onverdund sap, een met 2 maal en een met 4 maal met eene overeenkomstige HCl oplossing verdund sap.

De digestie werd gemeten na 5 uur en na 22 uur.

De cijfers geven het kwadraat van het aantal m.m. weer.

	onverdund	2 × verd.	4 × verd.
na 5 uur	1,2	0,64	0,16
na 22 uur	22.	15.2	7,3

Na 5 uur geven dus de voor oplossing 1 en 2 gevonden getallen de concentratie weer. Na 22 uur is het voor oplossing 1 gevonden getal te laag.

Na 5 uur heeft oplossing 3 nog te weinig verteerd om een betrouwbaar getal te geven. Na 22 uur vindt men juist hier de goede uitkomst.

Men mag dus aannemen, dat de getallen, zoover ze liggen ongeveer tusschen 1 en 15, werkelijk een juiste uitdrukking voor de concentratie zijn. Zeer sterke oplossingen zou men dus korten tijd moeten laten werken, terwijl voor zwakke oplossingen de digestie langer zou moeten worden voortgezet. Daar het nu in mijne proeven meestal niet aankwam

op zulke uitersten en het veelal te doen was om de verandering der werking van enzymoplossingen, die gedigereerd werden in verschillende phasen der digestie na te gaan, zou men door telkens een anderen duur voor de proef te kiezen moeilijk vergelijkbare getallen krijgen, tenzij de digestie zoo lang werd voortgezet, tot een voor alle proeven gelijk aantal m.m. opgelost was. Men zou in dat geval in den tijd een maat hebben voor de concentratie.

Wegens de groote bezwaren, die deze methode zou opleveren, heb ik den meer eenvoudigen weg gekozen. Was de werking zeer zwak geworden, dan werd de meting soms 2 maal op verschillende tijden verricht. Een bron van fouten zou nog kunnen gelegen zijn in de aanwezigheid van antipepsine. Volgens *Danilewsky* ¹⁾ komt toch in de maagmucosa een antipeptische stof voor, die door uittrekken met verdund zuur in de oplossing overgaat; zij is bestand tegen een temperatuur van 60 à 70°; het zou dus niet onmogelijk zijn, dat deze stof in mijne praeparaten voorkwam. *Danilewsky* vond evenwel, dat deze antipepsine door zure pepsine vernield wordt; daar de digestie der mucosae altijd minstens 36 uur werd voortgezet, is het niet waarschijnlijk, dat er in het filtraat nog veel van over is.

Bovendien kan het bij de reiniging van het enzym met de andere bijmengselen verwijderd zijn.

Ik heb dan ook noch in het kalfs-, noch in het varkensenzym ooit iets van antipepsine kunnen bespeuren, en men mag toch verwachten, dat bij het groot aantal op verschillende wijze verrichte proefnemingen een dergelijke stof niet in belangrijke hoeveelheid aanwezig kon zijn zonder hare tegenwoordigheid nu en dan te verraden.

¹⁾ Zie E. Henzel, Antipepsin als Ursache der Nichtselbstverdauung des Magens. ref. Jahresbericht über die Fortschr. der Thierchem. Bd. XXXIII, S. 556.

Evenmin heb ik de aanwezigheid kunnen bespeuren van eene stof, die de leb tegenwerkt.

Voor het vaststellen van het stremmend vermogen heb ik gebruik gemaakt van ontroomde koemelk, afkomstig van een zuivelfabriek, waar de melk van een groot aantal koeien dooreen gemengd en machinaal door centrifugeeren van de room ontdaan werd. Volgens opgave van de fabriek heeft deze melk een vrij wel constante samenstelling. Bovendien heb ik, wanneer het er op aankwam de verandering van het stollend vermogen eener enzymoplossing op verschillende dagen te vergelijken, steeds een controleproef genomen met een constant blijvende leboplossing. Hiervoor werd een praeparaat van van Hasselt gebruikt, tien maal verdund met gedistilleerd water; de gevonden stollingstijden bedroegen bijna altijd 35 seconden; ze waren nooit korter dan 30 seconden en nooit langer dan 40 seconden. Wanneer met zwakke enzymoplossingen gewerkt werd, werd veelal een proefje melk zonder toevoeging als controle gebezigd. Dit stold nooit voor afloop der proef, die somtijds 7 uur duurde, wel als het den nacht over in het waterbad bleef. Daar de proeven meestal minder dan een uur en bijna nooit langer dan 5 à 6 uur duurden, meende ik in deze melk een deugdelijk middel te hebben ter bepaling der enzymsterkte.

De reageerbuisjes, waarin de proeven werden gedaan, werden met warm zeepwater gereinigd, afgespoeld met leidingwater en in een kom gelegd, die gevuld werd met kokend water, waarin ze bleven tot het water eenigszins afgekoeld was, daarna werden ze boven de kachel of in een stoof gedroogd. Voor elke bepaling werd 8 c.m.³ melk gebruikt, die met een pipet in het reageerbuisje werd afgemeten. De buisjes werden zoo lang in een waterbad

van 37° gezet, tot de melk dezelfde temperatuur had aangenomen, dan werd ze overgegoten in een buisje, dat de gewenschte quantiteit enzymoplossing bevatte, nadat ook dit buisje eenigen tijd in het waterbad had gestaan; het mengsel werd even omgeschud en weer in het bad geplaatst; voor de tijdsbepaling werd het buisje al naar gelang van den te verwachten stollingstijd elke 5, 10, 15 seconden of met nog langer tusschenpoozen er even uit genomen en er onmiddellijk weer in gezet. De enzymoplossingen werden afgemeten met een pipet, die in $\frac{1}{10}$ c.m.³ was verdeeld. Het volume werd steeds gebracht op 2 c.m.³ Op deze wijze meende ik beter vergelijkbare uitkomsten te krijgen, dan door het toevoegen van verschillende hoeveelheden der oplossingen, terwijl het goed gemengd worden van het enzym met de melk er tevens door bevorderd werd.

Ik heb gewerkt met geneutraliseerde en zure enzymoplossingen. Voor de neutralisatie met natronloog werd de benoodigde hoeveelheid zure vloeistof afgemeten in een bekerglaasje. De loog, waarvoor een tiende normaal oplossing werd gebruikt, werd uit een buret droppelsgewijze toegevoegd onder voortdurend omschudden der vloeistof, ten einde plaatselijk optreden van alkalische reactie, die het enzym zou kunnen schaden, zooveel mogelijk te voorkomen.

De reactie werd bepaald met lakmoes- of lakmoïd-papier. De geneutraliseerde oplossing werd dan na al of niet verdunnen met water zoo spoedig mogelijk met de melk gemengd. Werd geneutraliseerd met CaCO_3 dan werd eerst de enzymoplossing in een buisje afgemeten en zoo noodig tot 2 cm³ aangevuld. Daarna werd gepulveriseerd CaCO_3 in geringe overmaat toegevoegd, omgeschud en het buisje 1 minuut in het waterbad gezet, waarna de melk er bij werd gegoten.

Van de kleine overmaat CaCO_3 heb ik geen invloed kunnen bespeuren.

Deze methode gaf ik de voorkeur boven het eerst verwijderen van het CaCO_3 door filtratie, omdat de werking na het neutraliseeren somtijds afneemt, zooals later zal blijken. Werd eerst gefiltreerd, dan vond ik den stollingstijd inderdaad vaak langer, dan wanneer op de gewone wijze werd gewerkt.

Voor de stremmingsproeven met zuur enzym werd de vloeistof door verdunning met water gebracht op eene aciditeit van 0,1% om zooveel mogelijk directen invloed van het zuur te vermijden. Het melk-enzym mengsel bevatte dan 0,02% HCl , en hiervan kan men geen belangrijke werking op de caseïne verwachten.

Om na te gaan in hoeverre de gevonden tijden voor de stolling de enzymconcentratie inderdaad weergeven werden met bekende verdunningen eenige proeven genomen, die op de volgende wijze werden ingericht: Een sterke oplossing van gezuiverd varkensenzym in 0,2% HCl werd voor een deel geneutraliseerd met $\frac{n}{10}$ NaOH ; bij de neutrale oplossing werd zooveel water gevoegd, dat het volume 2 maal zoo groot werd als dat van de zure oplossing. De verkregen vloeistof werd telkens 2 maal verdund met een NaCl oplossing die gemaakt was door 0,2% HCl te neutraliseeren met NaOH en met water aan te vullen tot het dubbele volume, een vloeistof, die dus, wat het NaCl gehalte betreft, overeen kwam met de enzymoplossing. Met elke verdunning werd een proef gedaan; de gevonden cijfers vormen kolom 1. Deze methode gaf ik de voorkeur boven het verdunnen met HCl en elke proef afzonderlijk neutraliseeren, omdat hieraan het bezwaar verbonden is dat de neutralisatie niet in alle proeven gelijk effect heeft. Het bezwaar der gevolgde methode is, dat het enzym voor de latere

proeven langer bij neutrale reactie gestaan heeft.

In kolom 2 vindt men de tijden, die gevonden werden bij neutralisatie met CaCO_3 . Hier werd met HCl verdund en elke proef afzonderlijk geneutraliseerd. Voor de eerste proef werd de oorspronkelijke oplossing 2 maal verdund met 0,2 % HCl om dezelfde hoeveelheid enzym te hebben als in de met natronloog geneutraliseerde.

De derde kolom stelt voor de werking bij zure reactie. In de eerste proef werd de oplossing 2 maal verdund met water, teneinde de enzymconcentratie weer gelijk te maken en tevens de aciditeit op 0,1 % te brengen. De verdere verdunning geschiedde met 0,1 % HCl .

In horizontale richting heeft men dus gelijk enzymgehalte, in verticale richting gelijk zout-, resp. zuurgehalte. Voor elke proef werd 8 c.m³. melk gebruikt en 2 c.m³. enzymoplossing.

	Verdunning	Geneutr. m. NaOH .	Geneutr. m. CaCO_3	Zure reactie.
1	onverd.	40 sec.	5 sec	5 sec.
2	2 × verd.	90 "	5 "	5 "
3	4 × "	7—17 min.	5 à 10 "	5 "
4	8 × "	meer dan 1 uur	15 "	10 "
5	16 × "		30 à 35 "	15 à 20 sec.
6	32 × "		80 à 90 "	30 "
7	64 × "		8—11½ min.	60 "
8	128 × "			110 "
9	256 × "			6 min.

In alle drie gevallen bestaat dus evenredigheid tusschen stollingstijd en verdunning. Het verschil is alleen hierin gelegen, dat bij neutralisatie met NaOH reeds bij 4 maal verdunnen de uitkomst onjuist is bij neutralisatie met CaCO_3 eerst bij 64 maal en bij zure reactie bij 256 maal verdunnen. Men mag

dus besluiten, dat de tijden bij neutralisatie met NaOH niet juist de concentratie weergeven, tenzij de oplossing zeer veel enzym bevat; bij neutraliseeren met CaCO_3 kan men ook bij verdunde oplossingen op de cijfers rekenen, terwijl men bij zure reactie zeer geringe hoeveelheden enzym kan meten. In proef 8 is 2 cm^3 van de 128 maal verdunde oplossing, die dus $\pm 0,008 \text{ cm}^3$ van de oorspronkelijke oplossing bevat, nog in staat de melk op den juisten tijd te doen stollen. De hoeveelheid enzym moet hier wel heel klein zijn. Eigenaardig is, dat in alle 3 kolommen de onjuiste uitkomst ten naastenbij voorkomt bij gelijken duur van de stolling.

De gelijke eerste 2 cijfers van kolom 2 en eerste 3 van kolom 3 zijn hieraan toe te schrijven, dat ik korter tijden dan 5 seconden niet goed kon bepalen zoodat 5 voor de eerste cijfers onjuist en te veel is. Voor het kalfsenzym werd een zelfde reeks proeven met verschillende verdunningen gedaan. De bereiding der oplossingen en de verdunning geschiedde op dezelfde manier als bij het varkensenzym.

	Verdunning	Geneutr. m. NaOH.	Geneutr. m. CaCO_3	Zure reactie.
1	onverd.	50 sec.	5 sec.	5 sec.
2	$2 \times$ verd.	95 "	10 "	5 "
3	$4 \times$ "	160—170 "	15 "	10 "
4	$8 \times$ "	330—375 "	20 "	15 "
5	$16 \times$ "	$8\frac{1}{2} - 12\frac{1}{2}$ min.	50 "	30 "
6	$32 \times$ "	24 "	100 "	55 "
7	$64 \times$ "	$37 - > 60$ "	$3\frac{1}{2}$ min.	2 min.
8	$128 \times$ "		$6\frac{1}{2}$ "	$4\frac{1}{2}$ "
9	$256 \times$ "		$15\frac{1}{2}$ "	13 "
10	$512 \times$ "		> 40 "	> 60 "

Na neutralisatie met natronloog zijn de uitkomsten hier dus beter dan bij het varkensenzym.

De tijden stemmen vrijwel met de verdunning overeen tot een 32 malige verdunning toe.

Wel komen reeds bij 8 maal verdunnen kleinere onregelmatigheden voor, maar over 't algemeen zijn de tijden ongeveer in overeenstemming met de concentratie. Bij 64 maal verdunnen was de stollingstijd zeer onbetrouwbaar. In mijne verdere proeven had ik meermalen gelegenheid bij met NaOH geneutraliseerde oplossingen dergelijke niet geheel prompte uitkomsten waar te nemen. Meestal deed ik dubbele proeven met dezelfde vloeistof met de bedoeling de juistheid der uitkomst zooveel mogelijk te controleeren. Daarbij kwam het nog al eens voor, dat twee gelijke proeven, wanneer de tijd althans eenige minuten bedroeg, een verschil opleverden.

Bij neutralisatie met CaCO_3 zijn de uitkomsten bijna geheel juist; de kleine afwijkingen in de eerste getallen laten zich gemakkelijk verklaren als men van beneden naar boven gaande de grootte der fouten berekent. Uitgaande van proef 5 zou men moeten vinden 50, 25, $12\frac{1}{2}$, $6\frac{1}{4}$, $3\frac{1}{8}$. Het is nu duidelijk, dat verschillen als $12\frac{1}{2}$ en 15, $6\frac{1}{4}$ en 10 bij zoo korte tijden wel vallen onder het bereik der waarnemings-fouten.

Wat de zure reactie betreft, hier zijn alle tijden iets korter, terwijl de juistheid der uitkomsten overeenkomt met die bij neutralisatie met CaCO_3 .

In bovenstaande gegevens heeft men ongeveer een maatstaf in hoe verre men uit de gevonden tijden het enzymgehalte mag beoordeelen.

Eenige Opmerkingen over Antistoffen.

Bij de beschrijving der enzym-bereiding merkte ik reeds op, dat het waarschijnlijk is, dat het varkens- en kalfsenzym, volgens Pekelharing's methode afgescheiden en gezuiverd, geen noemenswaardige hoeveelheid antistoffen bevat.

In het sap, dat ik verkreeg door kalfsmaagmucosae fijn te wrijven en uit te persen kon ik wel antipepsine aantoonen.

Het perssap werd aangezuurd tot 0,2% HCl. Werd dan een deel geneutraliseerd met NaOH en met water verdund tot 2 maal het volume, dan deed het de melk in de gewone verhouding van 2 op 8 stollen in $1\frac{1}{6}$ minuut; bij 2 maal verdunnen met 0,2% HCl en neutraliseeren met CaCO_3 was de tijd $\frac{1}{2}$ min. en bij 2 maal verdunnen met water 10 seconden.

Werd nu van het onverdunde perssap de proteolyse bepaald, dan vond ik in 5 uur een digestie = 0, in 24 uur was er nog onmeetbaar weinig, en in 102 uur 1,9 m.m. gedigereerd. Een uiterst geringe digestie dus in vergelijking met het zeer krachtig stremmend vermogen. Ik heb er reeds op gewezen, dat de oorzaak niet lag in scheiding der enzymen noch in de aanwezigheid van proenzym. Eerst heb ik nu getracht de pepsine door digestie der vloeistof werkzaam te maken. Na 4 dagen digereeren was de stollingstijd na neutralisatie met NaOH $1\frac{1}{2}$ min., met CaCO_3 $\frac{3}{4}$ min. bij zure reactie $\frac{1}{4}$ min. De digestie was in 5 uur = 0, in 24 uur = 0,4 m.m. Van een duidelijke toeneming der peptische werking blijkt dus niets.

Dit is nu niet in directe tegenspraak met de mededeeling van *Danilewsky* dat de antipepsine door zure

pepsine wordt vernield, want in een vloeistof als deze, waarin zooveel antipeptische stof aanwezig is, is te verwachten, dat ook de invloed van de pepsine op de antipepsine zelf zeer zal worden belemmerd.

Dat hier werkelijk een stof was, die de pepsine tegenwerkte, blijkt uit de volgende waarnemingen. Een hoeveelheid van het sap werd gedialyseerd tegen 0,2 % HCl en na 24 uur werd de digestie opnieuw bepaald. Deze bedroeg nu in 5 uur, 1,8 m.m., dus een belangrijke toeneming.

Nog duidelijker was de volgende proef: Met een deel van het perssap, dat 4 dagen gedigereerd was, werd een proef genomen en een andere met hetzelfde sap 4 maal verdund met 0,2 % HCl. De uitkomst was in 24 uur:

Onverdund sap — 0.4 m.m.

4 $\times$ verdund sap — 2,4 m.m.

Het verdunde sap werkte dus veel sterker, dan het onverdunde.

Zeër bewijzend is ook het volgende. Van een zeer werkzame kalfsenzymoplossing werd 1 c.m³. verdund met 9 c.m³. 0,2 % HCl en 1 c.m³. werd verdund met 9 c.m³. perssap, dat ook 0,2 % HCl bevatte.

Van beide vloeistoffen werd de proteolyse bepaald.

De proef duurde 21 uur:

Met HCl verdund enzym — 8,8 m.m.

Met perssap verdund enzym — 0,6 m.m.

Het perssap benadeelde dus de digestie belangrijk.

Opmerkelijk is, dat de hier aanwezige antistof zich alleen als antipepsine, niet als antileb voordeed, terwijl *Sawjalow* tot staving zijner meening, dat chymosinewerking berust op caseinedigestie, juist aanvoert, dat antistoffen beide reacties tegengaan.

Hij voegde daartoe aan de stremmingsproef albumose toe en bespeurde, dat deze de lebwerking tegen ging. Afgezien van de vraag of de hier aanwezige

antistof een albumose is, moet ik er op attent maken, dat uit bovenstaande proef met onverdund en 4 maal verdund sap blijkt, dat 4 maal verdunnen de antiwerking zeer veel geringer maakt. Bij de stremmingsproeven wordt de enzymoplossing door toevoeging der melk 5 maal verdund. Dit kan dus het verschijnsel heel wel verklaren.

De antistof wordt door neutraliseeren niet vernield.

Een hoeveelheid sap werd geneutraliseerd en bleef daarna 1 uur staan, in welken tijd een neerslag ontstond, dat door centrifugeeren verwijderd werd. De vloeistof vertoonde toen een stollingstijd van 1 min. Na aanzuren tot 0,2 % was de digestie in 5 uur = 0.

In aansluiting aan de beschreven uitkomsten met perssap kan ik eenige proeven vermelden met twee verschillende lebpraeparaten uit den handel.

Onderzocht werden een leboplossing van van Hasselt en een Deensche van Hansen. Beide praeparaten vertoonen neutrale of bijna neutrale reactie, hebben een sterk stremmend vermogen, maar aangezuurd, laten zij eiwit zoo goed als onaangetast.

Eenige cm³. leb van Hansen worden 10 maal verdund met water. Deze oplossing doet de melk in de gewone verhouding stollen in 30 seconden. 2 cm³. leb worden daarop verdund met 18 cm³. 0,2 % HCl. Deze oplossing, die dus bijna 0,2 % HCl bevat werkt als volgt:

2 × verdund met water	5 à 10 sec.
-----------------------	-------------

2 × verdund met water en geneutr. met CaCO ₃	20 „
--	------

Geneutr. met NaOH en verdund m. water tot 2 × het volume	40 „
---	------

De zure oplossing, niet verder verdund, digereert in 5 uur bijna niets. Evenals het perssap heeft deze oplossing naast een zeer sterk stremmend vermogen, bijna geen proteolytische werking.

Van hetzelfde lebpraeparaat wordt nu 40 c.m³. gedialyseerd tegen stroomend water. Na 24 uur is het volume toegenomen tot 70 c.m³. De vloeistof wordt uit den dialysator genomen en het enzym neergeslagen met verdund azijnzuur.

Door centrifugeeren en afgieten der vloeistof wordt het neerslag afgezonderd en opgelost in 0,2 % HCl.

Deze oplossing heeft nu ongeveer een gelijke werking op melk als de vorige, terwijl de eiwitbuisjes er veel meer door worden aangetast.

Gefiltreerd en verdund met 0,2 % HCl. De werking dezer oplossing is de volgende:

2 × verdund met water	10 sec.
2 × verd. m. water en geneutr. met CaCO ₃	20 "
Geneutr. m. NaOH en verdund m. water tot	
2 × 't volume	45 "
Digestie in 5 uur	2,1 m.m.

Werd de oplossing van met azijnzuur neergeslagen enzym nu nog 24 uur gedialyseerd tegen gedistilleerd water en het daarbij ontstaande neerslag opgelost in 0,2 % HCl, dan vertoonde zij bij ongeveer gelijke melkstroming een digestie van 2,3 m.m. Een belangrijke toeneming was hier dus niet meer bereikt.

Ook door dialyse alleen kan men deze praeparaten hare peptische werkzaamheid althans ten deele weer geven. Na 2 dagen dialyseeren tegen stroomend water en daarna 5 dagen tegen 0,2 % HCl vond ik, nadat de vloeistof met zoutzuur nog wat verdund was, het volgende:

2 × verdund met water	70 sec.
2 × verd. m. water en geneutr. m. CaCO ₃	3 min.
Geneutr. met NaOH en tot 2 × het volume	
verd. m. water	8 "
Dig. in 5 uur — 0,5 m.m.; in 24 uur — 3,2 m.m.	

In aanmerking genomen de veel zwakkere stremende werking van deze oplossing, ziet men dat de digereerende ook hier belangrijk was toegenomen.

Dezelfde resultaten verkreeg ik met het lebpraeparaat van van Hasselt.

Men is dus geenszins gerechtigd dergelijke leboplossingen scherp te onderscheiden van pepsinepraeparaten. Aan *Pawlow*, die over dit onderwerp meer uitgebreide onderzoekingen deed, gelukte het in alle hem ten dienste staande leb en pepsine praeparaten beide werkingen aan te toonen en te bewijzen, dat, waar een van beide scheen te ontbreken, zij slechts gemaskeerd was.

In de hier onderzochte handelspraeparaten zijn de zouten, die gewoonlijk ter conserveering worden toegevoegd mogelijk de oorzaak van de stoornis. Dat zelfs een NaClgehalte van 0,14% de digestie zeer merkbaar benadeelt, merkte ik reeds op.

Bij het perssap is het waarschijnlijk, dat het door *Danilewsky* en *Schwarz* in maagmucosae gevonden antipepsine het storende agens is.

Het neerslaan van proteolytisch en melkstremmend Enzym door Dialyse.

Onderscheidene methoden zijn door verschillende onderzoekers beproefd om te trachten eene scheiding teweeg te brengen tusschen pepsine en chymosine. Dialyse werd voor zoover ik vond door geen van allen voor dit doel aangewend.

Bij de enzymbereiding vermeldde ik reeds, dat sterke

enzymoplossingen, die 0,2 % HCl bevatten, als zij gedialyseerd worden tegen water, een deel van het enzym tegen den dialysatorwand afzetten, wanneer de aciditeit der vloeistof tot een zekeren graad gedaald is.

Volgens *Pekelharing* is bij een HCl gehalte van 0,02 % de oplosbaarheid van pepsine het geringst, terwijl zij door lage temperatuur nog sterk vermindert wordt. De vloeistof in den dialysator is dan evenwel nog niet van alle enzym bevrijd. Het zou nu zeer denkbaar zijn, dat pepsine en chymosine in deze omstandigheden verschil in oplosbaarheid vertoonden, zoodat een van beide bij een bepaalde aciditeit meer neersloeg dan de andere. Een bezwaar bij het vergelijken van het filtraat met het weer opgeloste praecipitaat is, dat het eerste meer verontreinigende stoffen bevat, zoodat geen volkomen vergelijkbaarheid bestaat, daar de bijmengselen op een van beide werkingen meer invloed kunnen hebben, dan op de andere.

Men mag uit dergelijke proeven dan ook alleen een besluit trekken, wanneer het gelukt eene oplossing te verkrijgen, waarin een der werkingen geheel of bijna geheel ontbreekt, terwijl de andere goed vertegenwoordigd is. Kleine verschillen hebben in dezen geen bewijskracht. In een vrij groot aantal vergelijkingen van digestie en stremming van de vloeistof en het opgeloste neerslag vond ik bijna steeds parallelisme beider werkingen; de enkele keeren, dat het parallelisme verbroken was, was het verschil te klein om het als bewijs voor de scheiding te doen gelden.

Uitgaande van de gedachte, dat er mogelijk maar een klein verschil in oplosbaarheid beider enzymen kon bestaan, heb ik beproefd door herhaalde dialyse van een zelfde hoeveelheid een duidelijk verschil te vinden. Hiertoe werden na 24 uur dialyseeren tegen gedis-

tilleerd water beide werkingen van een deel van het neerslag, opgelost in 0,2 % HCl en van de vloeistof bepaald en vergeleken. Het dialysaat werd eerst aangezuurd tot 0,2% HCl. De rest van het opgeloste praecipitaat werd dan opnieuw 24 uur gedialyseerd en hetzelfde herhaald. Dit geschiedde 6 keer achtereenvolgend. Indien de onderstelling opging, zou ik ten slotte een neerslag moeten krijgen, waarin een der enzymen in vergelijking met het andere geheel of voor een groot deel op den achtergrond trad.

De volgende cijfers geven de verhouding van stremmende en digereerende werking na de verschillende dialyses weer. De aciditeit van de vloeistof was na de eerste dialyse 0,03%, na de volgende was ze minder. Het is zeer moeilijk in dit opzicht overeenstemming te krijgen. De neutralisatie geschiedde met CaCO_3 . Voor de digestie werd 10 c.m³. vloeistof gebruikt van dezelfde concentratie als voor de stremming.

		Stoll.tijd	Digestie in 5 uren.
		—	—
1 ^e dial.	neerslag	0 sec.	7,7 m. m.
	vloeistof	0 "	8 "
2 ^e dial.	neerslag	0 "	7,1 "
	vloeistof	5 "	6,4 "
3 ^e dial.	neerslag	5 "	6 "
	vloeistof	10 "	4,8 "
4 ^e dial.	neerslag	10 "	6,3 "
	vloeistof	0 "	6,3 "
5 ^e dial.	neerslag	10 "	6,1 "
	vloeistof	15 "	5,2 "
6 ^e dial.	neerslag	15 "	5,6 "
	vloeistof	10 "	4,6 "

Ook door 6 keer dialyseeren was de verhouding der werkingen niet in die mate veranderd, dat men mag

besluiten, dat een der enzymen ten opzichte van het andere sterk was verminderd.

De kleine afwijkingen na de 4e en 6e dialyse leggen niet veel gewicht in de schaal, de korte stollings-tijden in aanmerking genomen. De hoofdzaak is, dat bij herhaald dialyseeren een toenemende wijziging in de verhouding niet is te constateeren. Het gelukt dus niet door dialyse de enzymen van elkaar te scheiden.

Nog op andere wijze heb ik de onscheidbaarheid der werkingen op de proef gesteld. Ten einde in eene oplossing van pepsine en anti-pepsine deze beide stoffen van elkaar af te zonderen, maakte Schwarz gebruik van de eigenschap der pepsine, in eiwit in te dringen. Deze methode heb ik nu ook aangewend voor eene enzymoplossing uit varkensmagen.

Geneutraliseerd met CaCO_3 deed deze oplossing de melk stremmen in 20 seconden, bij zure reactie 2 maal verdund met water in 15 seconden.

In 5 uur digereerde zij 2.1 m.m. van een eiwit buisje. 22 c.m³. dezer oplossing werd vermengd met stukjes fijn gewreven gestold kippeneiwit en bleef daarmee 21 uur op een koele plaats staan. Daarna werd gefiltreerd; het filtraat bedroeg 21 c.m³. Dit filtraat deed de melk stollen:

na neutralisatie met CaCO_3	niet in 6 $\frac{1}{2}$ uur;
bij zure reactie 2 $\times$ verd. met water	„ „ 6 uur;
bij zure reactie onverdund (0,2% HCl)	„ „ 5 uur.

De digestie bedroeg in 5 uur 0,08 m.m. in 21 uur 0,33 m.m.

De stukjes eiwit werden met 21 cm³ 0,2% HCl in de stoof gezet, na 24 uur waren ze geheel opgelost.

Proteolytisch en stremmend vermogen waren dus gelijkelijk door de stukjes eiwit geabsorbeerd. Ook

deze methode is dus niet in staat pepsine en leb te scheiden en, al moge zij de eenheid dezer enzymen niet bewijzen, de waarschijnlijkheid wordt er zeker door verhoogd.

Over het Onderscheid tusschen Chymosine en Parachymosine.

In Pflügers Archiv Bd. 79 verscheen eene publicatie van *Bang* over het melkstremmend enzym, dat voorkomt in pepsine-paeparaten, vergeleken met gewone leb. De aanleiding tot dit onderzoek was de bevinding van *Thunberg*, een van *Hammarsten's* assistenten, dat een pepsine-oplossing, die eenigen tijd gedigereerd werd, na neutralisatie met alkali geen stremming van melk meer kan te weeg brengen, wel daarentegen na neutralisatie met CaCO_3 . Hij werkte deze proef na en vond, uitgaande van eene sterke pepsine-oplossing, waarvan 1 cm³, met $\frac{1}{10}$ alkali geneutraliseerd, 10 cm³ melk oogenblikkelijk deed stremmen, dat de oplossing na eene digestie van 96 uur geen stremming meer kon verwekken, als ze met alkali geneutraliseerd werd; bij neutralisatie met CaCO_3 stolde de melk nog onmiddellijk en eerst na 11 dagen digereeren was het stremmend vermogen ook na neutralisatie met CaCO_3 verdwenen.

Dit was in strijd met de waarneming van *Hammarsten*, dat men in eene leboplossing door 24 à 48 uur digereeren alle leb kan vernietigen. Ter vergelijking herhaalde hij de proef met een leb-paeparaat uit den handel en met extract uit kalfsmagen en vond nu de lebwerking zoowel bij neutralisatie met alkali

als met CaCO_3 in 24—48 uur verdwenen. Aan dit verschil ontleent hij het recht de pepsineleb en de gewone als twee verschillende stoffen van elkaar te onderscheiden.

„Der Unterschied ist zweifach,” zegt hij. „Erstens musz man das Pepsinlab viel länger als das gewöhnliche digeriren, um die Labwirkung zu vernichten, wenn man, wie gewöhnlich, mit Alkali neutralisirt und zweitens kommt dann für das Pepsinlab eine Periode wo man zwar keine Labwirkung nach neutralisiren mit Alkali findet, nach Neutralisation mit kohlensaurem Kalk aber sehr deutliche, ja sogar starke Labwirkung demonstrieren kan, während das gewöhnliche Lab keine solche Periode gibt. Dieser Unterschied ist so bedeutend, dasz man berechtigt ist, darüber zu zweifeln ob nicht hier zwei verschiedene Fermente vorliegen.”

Door een viertal reacties tracht hij dan verder de juistheid dezer onderstelling te bewijzen. Het komt mij voor, dat hier grond bestaat voor enkele opmerkingen. *Bang* gebruikte twee verschillende pepsinepraeparaten, pepsinum siccum, een Zweedsch en een Deensch., die beide sterke lebwerking bezaten. Als leb gebruikte hij eene Zweedsche bereiding, — Barnekow's Löpe en extracten uit kalfsmagen. Het is mij nu niet duidelijk, hoe hij dus kan spreken van pepsineleb en gewone. Het kalfsmaag extract heeft toch evengoed digereerende als stremmende werking en handelsleb, zooals ik in een vorig hoofdstuk voor twee praeparaten aantoonde, ook, al moge de proteolyse door bijmengselen belemmerd zijn. Vermoedelijk zal Barnekow's Löpe in dit opzicht wel niet anders zijn. Of men nu een pepsine-oplossing heeft die tevens lebwerking vertoont, of een leboplossing, die ook proteolytisch werkt, maakt geen verschil en een onderscheiding van pepsineleb

en gewone is dus moeilijk te rechtvaardigen. In den loop zijner verhandeling geeft hij aan, dat de gewone leb (chymosine) het melkstremmend enzym der kalfsmagen is, terwijl bij het varken de pepsineleb (parachymosine) voorkomt. Ik heb mij daarom bij mijn onderzoek over chymosine en parachymosine aan dit onderscheid gehouden en gebruik gemaakt van enzymoplossing uit kalfs- en varkensmagen.

De bevinding van *Bang* dat chymosine door eene digestie van 24—48 uur geheel wordt vernield, kan ik niet bevestigen. Integendeel heb ik mij er dikwijls van kunnen overtuigen, dat een oplossing van kalfs-enzym gewoonlijk veel langer gedigereerd moet worden, voordat zij hare coaguleerende werking na neutralisatie met alkali verliest, een resultaat, dat ook door *Fuld* werd verkregen.

Wordt met CaCO_3 geneutraliseerd, dan kan men, evenals *Bang* voor parachymosine vond, nog veel langer stolling waarnemen. Ten bewijze mogen de volgende getallen dienen. De gebruikte enzymoplossing was gemaakt door fijngehakte kalfsmaagslijmvliezen 37 uur met 0,5% HCl te digereeren en daarna te filtreren: Het filtraat werd in een waterbad verder gedigereerd.

Bij de met NaOH geneutraliseerde proeven werd zoo-veel water gevoegd, dat het volume 2 maal zoo groot werd; de met CaCO_3 geneutraliseerde proef werd voor het toevoegen van het CaCO_3 2 maal verdund met water.

Neutralisatie	—	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH	NaOH	CaCO_3
Stollingstijd in min.	—	2 $\frac{1}{2}$	15 $\frac{1}{2}$	66	75	>180	3 $\frac{1}{2}$
Tijd gedur. welke de opl. gedig. was.	—	0	46	114	210	236	uur

Na 210 uur digereeren dus nog een stollingstijd van 75 min. en eerst na 236 uur was de tijd niet goed meer te bepalen; met CaCO_3 geneutraliseerd deed het

enzym de melk nog stollen in $3\frac{1}{2}$ minuut. Dat ook mijne gezuiverde praeparaten van kalfsenzym langer moesten digereeren blijkt uit de proeven in tabel I waar de stollingstijd eerst in 9 dagen toenam van $2\frac{5}{12}$ min. tot 45 min. terwijl de tijd bij neutralisatie met CaCO_3 op den 9en dag 110 sec. bedroeg en in tabel III, waar de tijd in 5 dagen toenam van $1\frac{5}{6}$ min. tot meer dan 2 uur, terwijl dezelfde hoeveelheid enzym, met CaCO_3 geneutraliseerd de melk deed stollen in 5 min. Het is trouwens moeilijk te begrijpen, dat in alle mogelijke enzymoplossingen, onafhankelijk van concentratie en bijmengselen, de leb steeds in denzelfden korten termijn zou vernield worden. Het moet toch wel verschil geven of men eene oplossing heeft met veel of weinig leb, met zwak of sterk digereerend vermogen.

Men moet echter den observatietijd niet al te kort nemen — bij *Bang's* proeven was deze 1 uur — en vooral daarom niet, omdat bij zwakke werking de tijd allicht wat langer uitvalt dan met de concentratie overeenkomt. In mijne proeven zou men na eene digestie van 114 uur bij een observatietijd van 1 uur reeds tot de afwezigheid van lebenzym besloten hebben.

Zooals later blijken zal meen ik echter aanleiding te hebben de afnemende der stremmende werking van gedigereerde enzymoplossingen bij neutrale reactie op andere wijze te verkaren.

De vier reacties die *Bang* aangeeft ter onderscheiding beider enzymen zijn: 1^e het verschillend gedrag bij verdunnen, 2^e bij toevoegen van chloorcalcium, 3^e verschillende resistentie tegen verhitten en 4^e tegenover alkali.

Ik heb bij oplossingen van kalfs- en varkensenzym deze reacties herhaaldelijk nagegaan; het resultaat laat ik hier volgen. Het lijkt mij doelmatig aan de

hand van *Bang's* mededeeling elk afzonderlijk in dezelfde volgorde te bespreken en met zijne uitkomsten te vergelijken.

De zoogenaamde tijdwet, door *Soxhlet* voor chymosine vastgesteld, mag volgens de meeste onderzoekers als juist aangenomen worden.

Herhaaldelijk heb ik mij er van overtuigd, dat inderdaad de stollingstijd evenredig is aan de verdunning, mits de verdunning niet al te ver gaat. Dan vond ik in twee opzichten eene afwijking; als met dezelfde verdunning twee of meer proeven gedaan werden, was er vaak verschil in tijd, zoodat men de werking niet meer als zoo nauwkeurig te bepalen mag beschouwen, als in sterkere oplossingen; in de tweede plaats werden de tijden dan wat langer dan te verwachten was.

Stollingstijden: $1\frac{2}{3}$ min. 3 min. $5\frac{1}{2}$ min. $11\frac{1}{3}$ min. 26 min.

Verdunning: onverdund $2 \times$ $4 \times$ $8 \times$ $16 \times$

Zijn de stollingstijden zeer lang geworden, dan vindt men ook niet meer het scherp waarneembare moment, waarin het vloeibare mengsel zich afscheidt in een coagulum en het heldere weiewit, maar langzamerhand komen er vlokken en het kan geruimen tijd duren, eerdat het komt tot volkomen stolling, die somtijds ook geheel uitblijft. Het bepalen van den tijd is in deze gevallen niet nauwkeurig mogelijk.

Parachymosine volgt nu naar *Bang's* mededeeling bij neutrale reactie de tijdwet niet. In sterke oplossingen zijn de tijden iets korter, dan de verwachte en bij verder verdunnen komt spoedig een moment, waar de tijden naar verhouding veel te lang zijn of stolling geheel uitblijft. Dit onderscheid heb ik ook gevonden tusschen het enzym van kalveren en van varkens, zooals een blik op bladzijde 40 en 41 duidelijk maakt.

Deze eigenaardigheid van de parachymosine is moei-

lijk te begrijpen. Dat het enzym door verdunnen met water vernield zou worden is niet waarschijnlijk; dit is door *Bang* aangetoond; als hij verschillende hoeveelheden onverdund enzym aan de melk toevoegde, vond hij het zelfde. Hij verdunde met water. Men zou dus kunnen onderstellen, dat het zoutgehalte in de minder verdunde proeven meer het optimum voor parachymosine nabij kwam. In mijne proeven bleef het zoutgehalte constant en toch was het verschijnsel niet minder duidelijk. Het schijnt wel, alsof er een bepaald stollingsvermogen aanwezig moet zijn om de voorhanden hoeveelheid caseïne in den juisten tijd om te zetten, want in alle drie kolommen (bladz. 40) ligt de grens der juiste uitkomsten ongeveer bij dezelfde tijden. Voor dat stollend vermogen is dan bij neutralisatie met NaOH meer enzym noodig dan bij neutralisatie met CaCO_3 en het minst bij zure reactie.

Voor het overzicht plaats ik de cijfers van bladz. 40 en 41 naast elkaar.

Varken		Kalf.	
Zure R	NaOH.	Zure R	NaOH.
5 sec.	40 sec.	—	—
5 „	90 „	5 sec.	50 sec.
5 „	7-17 min.	5 „	95 „
10 „	>60 „	10 „	160-170 „
15 à 20 „		15 „	330-375 „
30 „		30 „	8 $\frac{1}{2}$ -12 $\frac{1}{2}$ min.
60 „		55 „	24 „
110 „		120 „	37->60 „
360 „		255 „	
		780 „	
		>60 min.	

De varkensenzymoplossing, beoordeeld naar de stolling bij zure reactie, is 2 maal zoo sterk als die van het kalfsenzym. Wordt ze 2 maal verdund,

dan is het stollend vermogen bij zure reactie gelijk, bij neutrale reactie ± 2 maal zoo zwak. Bij 4 maal verdunnen komt de tijd bij neutrale reactie niet meer met de concentratie overeen en bij 8 maal verdunnen is de tijd reeds zeer lang. De overeenkomstige kalfsenzymoplossing geeft dan nog een stollingstijd van 160—170 seconden en stremt ook bij verdere verdunning nog overeenkomstig de concentratie. Vat men nu de stremming bij neutrale vloeistof op als eene vertraagde werking van het zure enzym, dan volgt daaruit, dat deze vertraging bij het varkensenzym groter is, dan bij het kalfsenzym. Dit stemt overeen met hetgeen *Bang* vond met betrekking tot het alkali.

Parachymosine is toch veel gevoeliger tegen alkali, dan chymosine. Neutrale reactie is nu evenmin onverschillig voor het enzym. Men kan er zich toch gemakkelijk van overtuigen, dat de neutrale reactie op den langen duur de werkzaamheid van het enzym doet afnemen. Met dezelfde geneutraliseerde varkens enzymoplossing, waarmee bovenstaande proeven gedaan werden, herhaalde ik 25 minuten na de neutralisatie de eerste twee proeven. Voor de eerste vond ik toen in plaats van 40 seconden, 50-á 60 sec. en 70 sec. Voor de tweede $3\frac{1}{2}$ minuut. Evenzoo vermindert de werkzaamheid als het varkensenzym met CaCO_3 geneutraliseerd is. Een door 4 maal dialyseeren gereinigde oplossing, geneutraliseerd met CaCO_3 deed de melk stollen in 25 seconden. Een deel der geneutraliseerde oplossing bleef 5 uur bij kamertemperatuur staan. De melk stremde met dezelfde hoeveelheid enzym nu niet in $1\frac{1}{2}$ uur. Verder heb ik herhaaldelijk gevonden, dat bij neutrale reactie, wanneer de oplossingen niet te sterk zijn, de uitkomsten niet altijd heel prompt zijn. Neemt men bijvoorbeeld twee proeven met dezelfde neutrale oplossing, dan dekken de uit-

komsten elkaar niet altijd. Ook is het niet hetzelfde of men eene kleine quantiteit neutraliseert of eene groote, al wordt er voor gezorgd, dat het alkali even voorzichtig en in minstens even groote hoeveelheid wordt toegevoegd. Ik vond bijvoorbeeld, wanneer ik $2\frac{1}{2}$ cm³. van eene oplossing neutraliseerde met 1,3 cm³. $\frac{n}{10}$ NaOH een tijd van 15 minuten. Neutraliseerde ik 10 cm³. van dezelfde oplossing met 5,3 cm³. NaOH, dan vond ik $12\frac{1}{2}$ minuut.

Dit alles is moeilijk te rijmen met een specifiek bij neutrale reactie werkend enzym en wijst veel eer op eene vertraging door de neutralisatie te weeg gebracht. Het eerste onderscheid tusschen chymosine en parachymosine zou dus herleid kunnen worden tot een verschil in gevoeligheid voor alkalische resp. neutrale reactie.

Ook de tweede door *Bang* aangegeven reactie ter onderscheiding van chymosine en parachymosine, de verschillende versnelling door CaCl_2 te weeg gebracht schijnt mij toe door mijne opvatting geheel verklaard te kunnen worden. *Bang* geeft aan, dat de versnelling door CaCl_2 voor parachymosine veel grooter is dan voor chymosine. Heeft men eene oplossing van parachymosine en een van chymosine, die bij neutrale reactie in denzelfden tijd melk doen stollen, dan zal een gelijke hoeveelheid CaCl_2 den stollingstijd van de parachymosine veel meer verkorten dan die van de chymosine. Naar hetgeen ik hierboven betoogd heb, zijn evenwel chymosine en parachymosine-oplossingen, die bij neutrale reactie de melk in denzelfden tijd doen stremmen geen zins gelijk van concentratie, als men het enzym gehalte berekent naar de werking bij zure reactie. De parachymosine-oplossing bevat meer enzym.

Laat ik mijn eigen proeven buiten rekening, dan volgt dit ook uit de proeven van *Bang* zelf. Hij ver-

gelijkt eene pepsine-oplossing met eene oplossing van Barnekow's Löpe in verschillende verdunningen.

	Ferment opl.	Water.	Melk.	Tijd voor Pepsine.	Tijd voor B Löpe.
1	1 cm ³		10 cm ³	2,30 min.	4 min.
2	$\frac{1}{2}$ „	$\frac{1}{2}$ cm ³	10 „	7,30 „	8,30 „
3	$\frac{1}{4}$ „	$\frac{3}{4}$ „	10 „	40 „	17 „
4	$\frac{1}{8}$ „	$\frac{7}{8}$ „	10 „	geen	38,30 „

In proef 1 is de pepsine-oplossing sterker dan de chymosine-oplossing, in de volgende 3 proeven dus ook en toch is in proef 3 de tijd voor de pepsine-oplossing 40, voor de chymosineoplossing 17 min. Waar dus een parachymosine-oplossing bij gelijken en somtijds zelfs bij langer stollingstijd meer enzym bevat dan een chymosine-oplossing, daar kan het geen verwondering baren, dat het toevoegen van eene gelijke hoeveelheid CaCl_2 in de meer geconcentreerde parachymosine-oplossing grooter versnelling geeft, dan in de chymosine-oplossing. Men heeft deze uitkomst dan evenwel niet zoo te formuleeren, dat CaCl_2 de parachymosine-reactie meer versnelt dan de chymosine-werking, maar dat de werking van parachymosine bij neutrale reactie trager is, dan die van chymosine.

Bang deelt verder mee, dat een kleine hoeveelheid CaCl_2 , die op chymosine geen versnellende werking meer heeft, de parachymosine-reactie nog wel bevordert en als grens geeft hij aan dat 0,02% CaCl_2 in het melk-enzym-mengsel op chymosine niet meer werkt, op parachymosine nog wel. Dit heb ik voor mijne chymosine-oplossingen niet gevonden; 0,02% CaCl_2 en zelfs minder veroorzaakte nog wel versnelling, zooals de volgende cijfers doen zien. Hiervoor werd gebruikt een oplossing van gezuiverd kalfsenzym, geneutraliseerd met $\frac{n}{10}$ NaOH.

Melk.	Neutr.en- zym opl.	Water	1 cm ³ CaCl ₂ opl.	CaCl ₂ gehalte van het melk enz mengsel.	Stoll. tijd
10 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	—	—	4 ¹ / ₂ min.
10 „	1 „	—	¹ / ₂ ‰	0,0416 ‰	40 sec.
10 „	1 „	—	¹ / ₄ ‰	0,0208 ‰	70 „
10 „	1 „	—	¹ / ₈ ‰	0,0104 ‰	110 „
10 „	1 „	—	¹ / ₁₆ ‰	0,0052 ‰	2 ¹ / ₂ min.
10 „	1 „	—	¹ / ₃₂ ‰	0,0026 ‰	3 „
10 „	1 „	—	¹ / ₆₄ ‰	0,0013 ‰	4 „

Ter vergelijking met eene door *Bang* vermelde proef met zwakker enzymoplossing, waarbij de stolling 13 min. duurde en na toevoegen van 0,02‰ CaCl₂ 12 minuten, werd dezelfde oplossing zoo veel verdund, dat de melk in 12 min. stremde.

Hierbij werd het volgende gevonden.

Melk.	Neutr.en- zym-opl.	Water.	1 cm ³ CaCl ₂ opl.	CaCl ₂ gehalte van het melk enz. mengsel.	Stoll.tijd.
10 cm ³	1 cm ³	1 cm ³	—	—	12 min.
10 „	1 „	—	0,4 ‰	0,033 ‰	2 „
10 „	1 „	—	0,2 ‰	0,0165 ‰	4 „
10 „	1 „	—	0,1 ‰	0,00825 ‰	8 ¹ / ₂ „

Herhaaldelijk heb ik deze uitkomsten gecontroleerd en steeds grooter invloed van CaCl₂ gevonden, dan door *Bang* wordt opgegeven.

Het tweede verschil tusschen chymosine en parachymosine kan dus tot het eerste worden teruggebracht.

Ik kom nu tot de 3^e en 4^e reactie, den invloed van verhitten en van alkali op parachymosine en chymosine. Voor een gemakkelijker overzicht zal ik deze twee reacties te gelijk behandelen.

Bang deelt mede, dat chymosine zeer gevoelig is voor verhitten. Een temperatuur van 70° is voldoende

het in korten tijd te vernielen bij neutrale reactie; bij zure reactie is het nog gevoeliger. Parachymosine daarentegen wordt zelfs gedurende 10 minuten niet door een temperatuur van 70° vernield, wel vermindert de werkzaamheid er door. Door een temperatuur van 75° wordt ook de parachymosine vernield; chymosine wordt zelfs na 1 min. verhitten tot 70° vernietigd. Men mag de parachymosine-oplossing evenwel niet geheel neutraliseeren, als gewoon lakmoes als indicator wordt gebruikt, wel als de reactie met lakmoëde bepaald wordt. Gebruikt men lakmoes, dan moet de reactie zwak zuur blijven, ongeveer 0,05% HCl. Ik heb nu wel lakmoëde gebruikt, maar daar dit zeer weinig van het lakmoes verschilde, heb ik hoofdzakelijk tegen lakmoes getitreerd, waarbij dan met de neutralisatie zoover werd gegaan, totdat het lakmoespapier nog een schijntje van roode kleur vertoonde. Door enkele tienden cm^3 kon dan de neutrale reactie bereikt worden, zoodat de oplossing de neutrale reactie zeer nabij was. Dan werden in 2 reageerbuisjes elk 2 cm^3 afgemeten en de buisjes in een bekerglas met water, dat op een temperatuur van 70° gehouden werd, gedompeld; door eenig heen en weer bewegen werd gezorgd, dat de oplossing zoo spoedig mogelijk de temperatuur van het water aannam. De verhitting werd steeds 10 minuten voortgezet, teneinde aan de uitkomst grooter zekerheid te geven. Dan toch is volgens *Bang* van chymosine geen spoor over, terwijl de parachymosine alleen wat verzwakt wordt. Na afloop werden de buisjes afgekoeld, weer tot 37° verwarmd en de 8 cm^3 melk toegevoegd.

Het 4^e onderscheid beider enzymen bestaat hierin, dat de parachymosine veel minder resistent is tegenover alkali, dan chymosine. Een alkali-gehalte van 0,01% vernietigt het eerste in $\frac{1}{2}$ uur, het tweede

ondervindt er slechts geringen invloed van. *Bang* vermeldt nu de volgende proef:

Een geneutraliseerde pepsineoplossing en een geneutraliseerd extract uit kalbsmagen werden elk in 2 deelen verdeeld en van beide de eene helft gekookt. Bij 5 cm³ ongekookte parachymosine-oplossing werd gevoegd 5 cm³ gekookte chymosine-oplossing, en bij 5 cm³ ongekookte chymosineoplossing, 5 cm³ gekookte parachymosine-oplossing. De mengsels deden eene gelijke quantiteit melk in 5 minuten en 6 minuten stollen. Aan beide werd alkali toegevoegd tot 0,01% en na ½ uur werd geneutraliseerd. Het mengsel met ongekookte parachymosine had zijne werking geheel verloren, het andere coaguleerde melk in 5 min. Hij besluit dus, dat de parachymosine vernield was, de chymosine intact gebleven, doch laat er op volgen, dat in andere proeven de parachymosine soms geheel vernield werd, soms eerst na werking van 1 uur, duidelijk geschaad. Wel was de invloed van het alkali steeds grooter dan op de chymosine.

De inrichting van de proef was gebaseerd op de bedoeling, voor beide enzymen volkomen gelijke condities te scheppen. *Bang* vond immers zelf, dat oplossingen, die veel albumosen bevatten resistenter waren tegen alkali dan meer zuivere. De albumosen beschermen het enzym, waarschijnlijk door binding van het alkali, voor vernieling. Meer of minder albumose in een van beide oplossingen, zou dus tot foutieve uitkomsten aanleiding geven. Dit trachtte hij nu te ontgaan door de vermelde wijze van proefneming.

Ik moet daartegen evenwel aanmerken, dat een gekookte enzymoplossing niet hetzelfde is, als een enzymoplossing, waarin alleen het enzym vernield is. De andere bestanddeelen ondergaan den invloed van het koken evenzeer. Ik vond bij verhitten van chy-

mosine-oplossingen tot 70° bij neutrale reactie gedurende 10 minuten, dat de oplossing soms sterk, soms licht troebel werd, somtijds ook geheel helder bleef; dat men dus door koken eene oplossing zou krijgen van vernield enzym en onveranderde bijmengselen is niet waarschijnlijk en dit ontnemt veel van de waarde aan de door *Bang* gevolgde methode.

Onderstelt men bijvoorbeeld, dat chymosine-oplossingen een tegen alkali beschermende stof bevatten, parachymosine-oplossingen niet, en dat deze stof door koken dit vermogen verliest, dan is daarmee het geheele verschil verklaard.

Het is moeilijk in eene oplossing het enzym te vernielen, zonder tevens groot gevaar te loopen, dat de bijmengselen verandering ondergaan. Door verhitten tot 80° bij zure reactie gedurende ongeveer een uur is het mij evenwel gelukt eene chymosine-oplossing hare stremmende werking te ontnemen, terwijl ze een duidelijken beschermenden invloed tegen alkali behield. Hiervoor gebruikte ik een filtraat van in 0.5 % HCl gedigereerde kalfsmaag-mucosae. Na het verhitten werd geneutraliseerd. De vloeistof bleef bij het verhitten en neutraliseeren volkomen helder, doch deed in de gewone verhouding melk niet stremmen in $3\frac{1}{3}$ uur. $12,7 \text{ cm}^3$ dezer vloeistof werd gevoegd bij 5 cm^3 eener zure oplossing van varkensenzym, en daarna werd het mengsel geneutraliseerd met $2,3 \text{ cm}^3 \text{ n}/_{10} \text{ NaOH}$.

Ter vergelijking werd 5 cm^3 van hetzelfde varkensenzym verdund met $12,7 \text{ cm}^3$ gedistilleerd water en geneutraliseerd met $2,3 \text{ cm}^3 \text{ n}/_{10} \text{ NaOH}$. Van beide mengsels werd de stollingstijd bepaald en de invloed van 10 min. verhitten op 70° en van alkali nagegaan. De neutralisatie was niet tot volkomen neutrale reactie voortgezet, daar men volgens *Bang* voor de verhitingsproef eene zwak zure reactie moet kiezen.

Voor de alkali-proef werd daarom eerst nauwkeurig geneutraliseerd, wat bij de eene vloeistof bereikt werd door $0,2 \text{ cm}^3 \text{ } n_{10} \text{ NaOH}$, bij de andere door $0,3 \text{ c.m}^3 \text{ } n_{10} \text{ NaOH}$ toe te voegen aan 9 cm^3 . Door $0,25 \text{ cm}^3 \text{ } n_{10} \text{ NaOH}$ werd aan de beide mengsels eene gelijke alkaliteit gegeven van ten naasten bij $0,01 \%$ en na $\frac{1}{2}$ uur staan werd dan het eene door $0,45 \text{ cm}^3 \text{ } n_{10} \text{ HCl}$, het andere door $0,55 \text{ cm}^3 \text{ } n_{10} \text{ HCl}$ terug gebracht tot dezelfde bijna neutrale reactie als te voren. Daar beide mengsels verschilden in NaCl gehalte, werd nog een derde gemaakt door 5 cm^3 varkensenzym-oplossing te verdunnen met $12,7 \text{ cm}^3$ van eene NaCl-oplossing, die overeenkwam met het geneutraliseerde kalfsmucosa filtraat en dit mengsel aan dezelfde bewerking te onderwerpen. De uitkomsten waren de volgende:

Enzymoplossing.		Na verhitten.	Na behandeling met alkali.
verd. met water.	$\frac{1}{2}$ min.	$2\frac{1}{2}$ min.	geen stoll. in $3\frac{1}{2}$ uur.
„ „ filtraat.	$\frac{1}{2}$ „	geen stoll. in $2\frac{1}{2}$ uur.	11 min.
„ „ NaCl opl.	50 sec.	?	geen stoll. in 4 uur.

Bij verhitten gedroeg het met water verdunde varkensenzym zich dus als parachymosine, na toevoegen van verhitte chymosine oplossing, als chymosine. Verdund met NaCl-oplossing begon de melk na 13 min. vlokkelig te worden, er kwam en stolsels in, maar tot volkomen stremming kwam het niet. Er blijkt dus niet duidelijk of de verhitte chymosine-oplossing de parachymosine minder bestand deed zijn tegen verhitten, of dat dit aan het hooger NaCl gehalte te wijten is. Uit latere proeven blijkt, dat de bestanddeelen van eene chymosine-oplossing ook hier hoogstwaarschijnlijk van invloed zijn.

Wat de resistentie tegen alkali betreft, gedraagt het varkensenzym zich als parachymosine zoowel na

verdunnen met water als met NaCl oplossing. Toevoeging van verhitte chymosineoplossing oefent daarentegen een belangrijken beschermenden invloed uit. Dat deze beschermende eigenschap door verhitten tot 80° zou zijn ontstaan, is minder waarschijnlijk dan dat zij door koken in *Bang's* proeven zou zijn verloren gegaan.

Ik heb verder niet *Bang's* methode gevolgd met gemengde enzymoplossingen, maar eenvoudig bij verschillende kalfs- en varkensenzymoplossingen den invloed van alkali en verhitten onderzocht.

Voor varkensenzym vond ik, dat het zich inderdaad tegenover alkali en verhitten voordeed als parachymosine. De volgende cijfers, gevonden met eene oplossing van gezuiverd varkensenzym in $0,2\%$ HCl geven dit duidelijk weer. Naar aanleiding van *Bang's* opmerking, aangaande de mogelijkheid, dat parachymosine en pepsine identiek zouden zijn, werd ook de invloed op het digereerend vermogen bepaald. De oplossing werd geneutraliseerd tot zeer zwak zure reactie, de stollingstijd bepaald, waarna 8 cm^3 der geneutraliseerde vloeistof werd aangezuurd met 2 cm^3 2% HCl. Nadat de vloeistof op de boven beschreven wijze deels 10 min. aan een temperatuur van 70° , deels aan een alkaligehalte van $0,01\%$ gedurende $\frac{1}{2}$ uur was blootgesteld geweest, werd eveneens van beide 8 cm^3 aangezuurd tot $0,4\%$ HCl, en hiervan de digestie bepaald:

		Na verhitten.	Na alkali behandeling.
Stollingstijd:	25 sec	40 sec.	geen stoll. in $5\frac{1}{2}$ uur.
Digestie in 5 uur:	6,76	4,41	0
2 ^e macht van het aantal m. m.			

De stollingsproeven geschieden als bij de eerste proef en werden alle dubbel genomen als controle. De uitkomsten waren gelijk.

Dit enzym gaf dus duidelijk de parachymosinereactie.

De invloed van verhitten en alkali op het digereerend vermogen was volkomen evenredig aan die op het stremmend vermogen. Na verhitten was de stollingstijd immers $\frac{8}{5}$ maal zoo lang, de digestie $\frac{8}{5}$ maal zoo gering, door alkali waren beide werkingen 0 geworden.

Een andere proef gaf in zooverre andere uitkomsten, dat hier de invloed van alkali, hoewel grooter dan die van verhitten, niet zoo sterk was, als in de vorige proef. Het digestie vermogen was evenwel daarmee evenredig ook minder afgenomen.

		Na ver- hitten.	Na alkali be- handeling.
Stollingstijd:	5 à 10 sec.	15 sec.	30 sec.
Digestie in 5 uur:	11,56.	7,84	4,81
2 ^e macht v. h. aantal m.m.			

In tegenstelling met *Bang* vind ik dus, dat geenszins door verhitten en alkali-inwerking kan aangetoond worden, dat parachymosine en pepsine twee verschillende enzymen zijn; integendeel pleit de gelijke invloed van beide op stollend en peptoniseerend vermogen sterk voor de eenheid beider stoffen.

Wat het enzym uit kalfsmagen betreft, hier heb ik verschillende uitkomsten verkregen. Werd een filtraat van gedigereerde kalfsmaagmucosae gebruikt, of een bij kamertemperatuur bereid extract daarvan, dan bleek dit niet bestand tegen verhitten, veel beter tegen de werking van alkali. Ter illustratie vermeld ik een proef met extract uit kalfsmaag-slijmvliezen. 370 gram mucosae werden fijngehakt en eenige uren

bij kamertemperatuur met 1 L 0,4% HCL uitgetrokken. Daarna werd gefiltreerd en het filtraat 24 uur gedialyseerd tegen stroomend water; het neerslag dat daarbij ontstaan was werd door centrifugeeren verwijderd en de vloeistof aangezuurd tot 0,2% HCl. Na neutraliseeren met natronloog werd de stremmingstijd bepaald en de invloed van verhitten en alkali onderzocht.

	Na verhitten	Na alkali behand.
Stoll. tijd: 20 sec.	geen stolling in 2 uur	35 sec.

Deze oplossing gedraagt zich dus als chymosine; anders was het met het kalfsenzym, als het op de gewone wijze was afgezonderd en gereinigd. Dan werd de invloed van alkali veel grooter, maar die van verhitten tegelijk kleiner. Ten bewijze laat ik hier de getallen volgen, verkregen met een door dialyse gezuiverd kalfs-enzym. Evenals bij de proeven met varkensenzym werd ook hier de digestie bepaald:

		Na ver- hitten.	Na alkali be- handeling.
Stollingstijd:	3 $\frac{1}{2}$ min.	7 $\frac{1}{2}$ min.	geen stolling in 7 uur.
Digestie in 20 uur:	15,21	4,84	0
2 ^e macht v. h. aantal m. m.			

Behalve, dat deze oplossing minder sterk werkte, was er geen onderscheid met de vroeger vermelde parachymosineproef. De digestie vermindering was bijna volkomen evenredig aan het verlies aan stollend vermogen. Ik heb deze proeven nu meermalen herhaald met gezuiverd kalfs-enzym en telkens het zelfde gevonden, mits de reiniging nauwkeurig geschied was. Ik vermeld nog eenige getallen, die werden gevonden met eene andere hoeveelheid door dialyse afgezonderd kalfs-enzym.

		Na ver- hitten.	Na alkali be- handeling.
Stollingstijd :	7 1/2 min.	11 min.	geen stolling in 5 1/2 uur.
Digestie in 5 uur :	4.	1,96.	0
2 ^e macht v. h. aantal m. m.			

Het gelukt nu niet altijd het kalfs-enzym op de door mij gevolgde wijze dadelijk zeer rein te verkrijgen. Een met loodacetaat en ammoniak neergeslagen en volgens de gewone methode behandeld enzym, gaf na de laatste dialyse tegen gedistilleerd water een vrij groot neerslag, dat door centrifugeeren werd afgezonderd en opgelost in 40 cm³ 0,2% HCl. De groote hoeveelheid neerslag in verhouding tot de geringe hoeveelheid HCl deed eene geconcentreerde oplossing verwachten en des te meer, omdat de vloeistof bij het neutraliseeren een weinig troebel werd. De stollingstijd bedroeg 3 1/3 min. en beantwoordde dus niet aan de quantiteit opgeloste stof. Het was dus zeker, dat het enzym vrij sterk verontreinigd moest zijn. Deze oplossing gedroeg zich nu tegenover verhitten en alkali geheel als chymosine; het digestie vermogen bleek evenredig met de stremmende werking.

		Na ver- hitten.	Na alkali be- handeling.
Stollingstijd :	3 1/3 min.	geen stoll. in 5 uur.	6 1/2 min.
Digestie in 5 uur :	2,25	0	0,81
2 ^e macht v. h. aantal m. m.			

Na de vermelde proeven begon ik sterk te twijfelen aan de juistheid van het door *Bang* aangegeven verschil tusschen chymosine en parachymosine. Het had

er allen schijn van dat chymosine niet anders was, dan verontreinigde parachymosine. Vooral het steeds gepaard gaan van resistentie tegen alkali en gevoeligheid voor verhitten bij de ongezuiverde en het omgekeerde bij de zuivere oplossingen deed het vermoeden voor de hand liggen, dat in de bijmengselen de oorzaak van het verschil was te zoeken. Dat er door de behandeling van het enzym, die vroeger uitvoerig beschreven is, iets anders zou plaats hebben, dan het verwijderen van verontreinigende stoffen, is niet aannemelijk vooral voor de 1^e portie enzym, die door dialyse in het filtraat der gedigereerde slijmvliezen wordt gepraecipiteerd.

Daar mijne enzymbereiding evenwel van die van *Bang* verschilde, heb ik ook een extract uit kalfsmagen onderzocht. 350 gram fijngehakte slijmvliezen werden eenige uren met 1 L 0,4% HCl uitgetrokken bij kamertemperatuur. Door filteren werd een heldere vloeistof verkregen, die duidelijk chymosine-reactie vertoonde.

	Na verhitten.	Na alkali behand.
Stoll. tijd:	15 sec. geen stolling in 30 min.	15 sec.

De rest van het extract werd 2 dagen gedialyseerd tegen stroomend water; er ontstond een neerslag, dat werd afgezonderd door de centrifuge en opgelost in een weinig 0,2% HCl. Deze oplossing werd 24 uur gedialyseerd tegen gedistilleerd water en het neerslag dat nu ontstaan was, opgelost in 0,2% HCl, geneutraliseerd en op de gewone wijze onderzocht.

	Na verhitten.	Na alkali behandeling.
Stollingstijd:	10 sec. 12½ min.	geen stolling in 30 min.

Al moge het verhitten dit enzym ook nog belangrijk beschadigen, zoo neemt de werking toch veel minder af, dan bij hetzelfde enzym vóór het reinigen.

Het is in zijne verhouding tegenover verhitten en

nog veel meer tegenover alkali de parachymosine sterk genaderd. Het is ook zeer waarschijnlijk, dat het enzym niet van alle bijmengselen geheel bevrijd werd, zoodat men mag onderstellen, dat het er geheel mee zou overeenstemmen, als men er in slaagde het geheel van verontreiniging te ontdoen.

Het leb-praeparaat van van Hasselt en dat van Hansen heb ik aan een zelfde onderzoek onderworpen.

Een hoeveelheid leb-oplossing van van Hasselt werd 24 uur gedialyseerd tegen stroomend water om de zouten te verwijderen, daarna werd het enzym neergeslagen met verdund azijn-zuur en door centrifugeeren afgescheiden; na uitwasschen met water en opnieuw centrifugeeren, werd het neerslag opgelost in 0,2% HCl en na eenig verdunnen en neutraliseeren onderzocht. Ter vergelijking werd ongezuiverde leb gebruikt, 10 maal verdund met water.

		Na verhitten.	Na alkali behandeling.
Stoll. tijd der verd. leb :	45 sec.	geen stoll. in 1½ uur.	45 sec.
" " " met CH ₃ COOH neergeslagen leb :	45 sec.	9 min.	7 min.

De gewone leb gaf dus chymosine reactie, na zuivering naderde zij tot de parachymosine. Op dezelfde wijze behandeld, doch na het neerslaan niet uitgewasschen met water, vertoonde leb van Hansen wel minder resistentie tegen alkali doch de gevoeligheid tegen verhitten was gelijk gebleven. Een deel van het in HCl opgeloste enzym werd nu 24 uur gedialyseerd tegen gedistilleerd water en nu kwam het met parachymosine overeen. Ter vergelijking werd weer met water verdunde leb gebruikt.

	Na verhitten.	Na alkali behand.
Stoll. tijd. der verdunde leb : 30 sec.	geen stoll. in 2 u.	40 sec.
Stoll. tijd na neerslaan met CH ₃ COOH: 30 sec.	„ „ „ 1 u.	1 ³ / ₄ min.
Stoll. tijd na neerslaan met CH ₃ COOH en dialyse: 1 ¹ / ₂ min.	5 ¹ / ₂ min.	13 min.

Ook deze handelspraeparaten verliezen dus door reiniging hun chymosine karakter tegenover alkali en verhitten.

Daar nu de 3^e en 4^e reactie van *Bang* blijken te berusten op bijmengselen, die in de chymosine-oplossingen aanwezig zijn en de 2^e reactie, zooals ik boven aantoonde, tot de 1^e herleid kan worden, blijft geen ander onderscheid tusschen chymosine en parachymosine over, dan het verschil in vermindering der werking bij verdunning der geneutraliseerde oplossingen.

Ik heb er reeds op gewezen dat neutrale reactie voor het enzym evenmin onverschillig is als alkalische, dat het onder sommige omstandigheden door neutralisatie veel van zijne werkzaamheid verliest. In het volgende hoofdstuk zal ik nog eenige feiten hebben aan te halen, die dit bevestigen. *Pawlow* vond, dat neutralisatie met Na₂CO₃ vernieling van het enzym ten gevolge had; hij werkte met hondemaagsap, dat weinig bijmengselen bevat.

Ik heb ook eenige keeren maagsap van den hond onderzocht en vond, dat dit bij goede digestie en krachtige stremmende werking bij zure reactie en na neutralisatie met CaCO₃, zeer geringe werking vertoonde, als het met NaOH werd geneutraliseerd.

Becker ¹⁾ vond, dat zijn enzym minder werkte, als hij het neutraliseerde en aan aangezuurde melk toevoegde, dan wanneer hij het zure enzym aan gewone

¹⁾ Hofm. Beiträge Bd. VII, S. 115.

melk toevoegde; zelfs kon hij vermindering der werking constateeren, als hij het sap eerst neutraliseerde en daarna weer zuur maakte. Hij schrijft dat toe aan gevoeligheid van het maagsap voor alkali. *Petry* kon door digestie met Na_2CO_3 zijne leb-oplossingen minder werkzaam maaken. Dit alles wijst er op, dat niet alleen overmaat van alkali, maar zelfs neutrale reactie schadelijk is voor het enzym. Dat een alkali-gehalte van 0,01%, dat dus de grens van zuur en alkalisch maar even overschrijdt, onder sommige omstandigheden het enzym in $\frac{1}{2}$ uur totaal onwerkzaam maakt, heb ik hierboven aangetoond. Op den aard en het verschil van de werking van het alkali zal ik niet trachten nader in te gaan. Bij de gebrekkige kennis van de bestanddeelen der enzym-oplossingen zou ik mij met gissingen moeten tevreden stellen. Dat evenwel de bestanddeelen, die de vloeistof behalve het enzym in oplossing houdt, van groot belang zijn voor de uitwerking van het alkali, dat meen ik te hebben aangetoond, en daaruit meen ik met eenig recht te mogen afleiden, dat ook bij de toevoeging van alkali, die niet verder gaat, dan de neutrale reactie, de bijmengselen het verschil verklaren, dat door *Bang* werd gevonden tusschen chymosine en parachymosine bij neutrale reactie. Dat het mij niet gelukt is eene oplossing van kalfsenzym zoo zuiver te bereiden, dat zij ook in dit opzicht zich als parachymosine voordeed, dat meen ik te mogen toeschrijven aan de onvolkomenheid der bereidingswijze, die niet toeliet het kalfsenzym geheel van zijne bijmengselen te ontdoen. Wel kan ik er op wijzen, dat mijne praeparaten zich niet, zooals die van andere onderzoekers, tot zeer vergaande verdunning aan de tijdwet hielden. Maar zoo groote gevoeligheid voor alkali als bij het varkensenzym, heb ik niet bereikt.

De overeenkomst van het stremmend en digereerend enzym tegenover verhitten en alkali en de verandering, die het weerstandsvermogen onderging door het zuiveren der oplossing leidden mij er toe nader te onderzoeken, hoe het enzym zich gedraagt tegenover neutraliseeren voor- en nadat het eenigen tijd gedigereerd is.

Dit onderzoek zal ik in het volgende hoofdstuk mededeelen.

Over de Vermindering van proteolytisch en melk-stremmend Enzym door Digestie.

Hammarsten toonde aan, dat zure chymosine oplossingen, die bij 37—40° gedigereerd werden, na eenigen tijd het vermogen verloren, na neutralisatie met alkali melk te doen stremmen, terwijl eiwit bij zure-reactie er nog door werd opgelost. Hij besloot daaruit dat de leb vernield was, de pepsine niet. Later legde *Schmidt Nielsen* met een kleine wijziging der proeven er nogmaals den nadruk op, dat hierin een bewijs is gelegen, dat pepsine en leb twee afzonderlijke stoffen zijn.

Zooals ik in het vorige hoofdstuk heb meegedeeld vond ik, dat onreine en gezuiverde enzym-oplossingen uit kalfsmagen een verschillend weerstands vermogen bezitten tegenover alkali, en dat de oorzaak hiervan gelegen is in eene stof, die het enzym tegen de schadelijke werking beschermt. De minder sterke werkzaamheid van varkens-enzym dan van kalfs-enzym bij neutrale reactie meende ik hieraan te mogen toeschrijven, dat het kalfs-enzym nooit geheel van deze beschermende stof bevrijd werd. De mogelijkheid lag nu voor de hand, dat deze stof door digestie vernield

kon worden, zoodat het enzym in eene oplossing, die aan digestie werd onderworpen, niet alleen afnam in quantiteit, maar ook gevoeliger werd voor neutraliseeren. Ik heb nu getracht deze onderstelling aan de waarneming te toetsen en onderzocht daartoe in verschillende phasen der digestie het stollend vermogen bij neutrale reactie en de digereerende werking van de zure oplossing en van de geneutraliseerde oplossing, nadat zij weer was aangezuurd. Werd het enzym door digestie inderdaad gevoeliger voor neutraliseeren, dan moest dit ook merkbaar zijn in de digestieproef met de oplossing die geneutraliseerd geweest was. Ik maakte eene oplossing van gezuiverd kalfsenzym; de eerste (dialyse-enzym) en tweede portie (loodacetaat-enzym) werden samengevoegd en opgelost in 0,2% zoutzuur. Deze vloeistof werd in twee deelen verdeeld; het eene deel werd bij 37° in de broedstoof gedigereerd, het andere bij lage temperatuur bewaard.

Tabel I A geeft de cijfers voor de gedigereerde oplossing. Hier, evenals in alle volgende proeven, werden de stollingstijden telkens twee maal bepaald, ten einde de uitkomsten zoo veel mogelijk te controleeren; leverden zij verschil op, dan werden beide ingevuld, steeds werd 8 cm³ melk gebruikt en 2 cm³ enzym oplossing. De eerste bepalingen op 14 April geschieden, voordat de vloeistof in de stoof werd geplaatst. Op de dagen, in kolom 1 aangegeven, werd telkens eene hoeveelheid van de vloeistof geneutraliseerd en met gedistilleerd water tot het dubbele volume aangevuld. Kolom 6 geeft aan hoeveel telkens werd genomen. Met de geneutraliseerde vloeistof werden dan de stollingsproeven gedaan, die in kol. 2 zijn opgeteekend. Van 9 cm³ neutrale vloeistof, aangezuurd met 1 cm³ 2% zoutzuur werd de digereerende werking onderzocht. Deze vindt men in kol. 3.

Ter vergelijking werd de proteolytische werking van het enzym bepaald in dezelfde phase der digestie, doch niet geneutraliseerd (kol. 4). Hier werd gebruikt $4\frac{1}{2}$ cm³ zure enzym-oplossing, verdund met $5\frac{1}{2}$ cm³ 0,2% zoutzuur, overeenkomstig kol. 3. Voor kol. 5 werd eveneens de zure enzym-oplossing gebruikt, doch hier werd behalve het enzym- en HCl- ook het NaCl gehalte gelijk gemaakt met dat van de proef in kol. 3. In kol. 7 vindt men de stremmingstijden met eene 10 maal verdunde leb-oplossing van van Hasselt, om de melk op de verschillende dagen te controleeren.

Vergelijkt men nu kol. 2 met kol. 4, dan ziet men in de eerste dagen geen sterke vermindering der lebwerking in verhouding tot de vermindering der digestie. Integendeel, neemt de proteolytische werking een weinig meer af, dan de stremmende. Op 22 April was dit plotseling veranderd; terwijl de pepsine-werking onbelangrijk was verminderd na de vorige bepaling, vorderde de stremming 4 maal zooveel tijd. Dit is moeilijk te rijmen met de voorstelling van *Hammarsten*. Als de leb door digestie vernield werd, zou men toch verwachten, dat dit geleidelijk van het begin af plaats had en niet eerst ongeveer evenredig met de auto-digestie der pepsine en na verloop van eenige dagen veel meer. Het verschijnsel laat zich daarentegen zeer goed verklaren, als men aanneemt, dat het enzym tijdens de digestie door vernieling eener beschermende substantie gevoeliger wordt voor neutraliseeren. De gebruikte oplossing bevatte dan veel van deze stof, zoodat eerst na eene digestie van 8 dagen zooveel was vernield, dat de rest niet meer in staat was den schadelijken invloed van het neutraliseeren tegen te gaan. Des te meer wordt men van de juistheid dezer verklaring overtuigd, als men kol. 3 vergelijkt met kol. 4. Gedurende de eerste dagen had het neutrali-

seeren weinig invloed op de proteolytische werkzaamheid van het enzym, op 20 April was het verschil der uitkomsten nog gering en 2 dagen later in overeenstemming met de sprongsgewijze vermindering van het stremmend vermogen, vindt men voor het enzym dat geneutraliseerd is geweest 8 maal geringer digestie, dan bij het andere, dat deze bewerking niet heeft ondergaan. Dat het bij de neutralisatie ontstaande NaCl niet de oorzaak is van de geringe digestie blijkt uit de getallen van 23 April kol. 3 en 5. Wel werd de digestie door toevoeging van NaCl gestoord, maar de werking van het geneutraliseerde enzym was toch 9 maal kleiner, dan van de niet geneutraliseerde, oplossing die evenveel NaCl bevatte. Tusschen 20 en 22 April was dus het gehalte aan beschermende stof zoo gering geworden, dat het alkali het enzym, zoowel het proteolytische, als het stremmende kon aantasten. Als dit nu zoo is, dan moet men vinden, dat een niet gedigereerde enzym-oplossing beter bestand is tegen neutraliseeren met alkali, ook wanneer zij te voren met zoutzuur verdund wordt. Het pepsine gehalte der gedigereerde oplossing was op 23 April ongeveer tot $\frac{1}{6}$ afgenomen. Dienovereenkomstig werd dat deel van de enzym-oplossing, dat bij lage temperatuur bewaard was, 6 maal met 0,2% zoutzuur verdund en op dezelfde wijze onderzocht als de gedigereerde oplossing; de uitkomsten vindt men in tab. I B. De proteolytische werking van het zure enzym stemt ongeveer overeen met die van de gedigereerde oplossing op 23 April en in de proef, waar NaCl is toegevoegd is zij geheel gelijk. De invloed van neutraliseeren op het digestie vermogen is echter veel geringer, en in overeenstemming daarmee is de stremmingstijd bij neutrale reactie veel korter. Het proteolytisch, zoowel als het stremmend-enzym is in deze oplossing dus

veel resistenter tegen neutralisatie, dan in de gedigereerde.

Een nieuwe reeks proeven (Tabel II) gaf even duidelijke uitkomsten. De bepalingen werden hier vollediger gedaan en ook de verandering van de melkstremmende werking bij zure reactie onderzocht. Op 1 Mei werd de oplossing in de broedstoof gezet, nadat eerst een bepaling gedaan was. Op de dagen in kol. 1 aangegeven, werd 10 cm^3 van de vloeistof afgemeten, geneutraliseerd met $\frac{n}{10}$ NaOH-oplossing en met gedistilleerd water tot het dubbele volume verdund (zie kol 13). De neutrale vloeistof werd dan in 4 porties verdeeld; twee van 2 cm^3 waarmee de stremmingstijd bij neutrale reactie werd bepaald (kol 2), een van 9 cm^3 die na aanzuren met $1\text{ cm}^3\ 2\%$ HCl moest dienen voor de digestie proef (kol. 5) en een van 6 cm^3 , die door $0,3\text{ cm}^3\ 2\%$ HCl oplossing gebracht werd op eene aciditeit van $0,1\%$. Met de laatste portie werd dan de stremming bij zure reactie bepaald, waarvoor in 2 proeven 2 cm^3 aangezuurde oplossing werd gebruikt (kol. 3) in 2 andere $0,4\text{ cm}^3$, verdund met $1,6\text{ cm}^3$ gedistilleerd water (kol. 4). De getallen van kolom 6, 7 en 8 stellen voor de werking der zure enzym-oplossing na toevoeging van zooveel NaCl als de overeenkomstige geneutraliseerde oplossing bevatte. De vloeistof werd daartoe 2 maal verdund met eene NaCl-oplossing, die per cm^3 2 maal zooveel keukenzout bevatte als de geneutraliseerde enzym-oplossing. Voor de stolling werd dan gebruikt 2 cm^3 en $0,4\text{ cm}^3$ verdund met $1,6\text{ cm}^3$ water (kol 6 en 7); voor de digestie 9 cm^3 waaraan was toegevoegd $\frac{1}{2}\text{ cm}^3\ 0,2\%$ zoutzuur en $\frac{1}{2}\text{ cm}^3\ 2\%$ zoutzuur. (kol. 8). In kolom 9, 10 en 11 werd alleen het enzym- en zuurgehalte gelijk gemaakt door toevoeging van water, resp. zoutzuur. In kol. 9 werd gebruikt 1 cm^3 oplossing $+ 1\text{ cm}^3$ water,

in kol. 10, $0,2 \text{ cm}^3$ oplossing $+$ $1,8 \text{ cm}^3$ water, en in kol. 11, $4\frac{1}{2} \text{ cm}^3$ oplossing $+$ $5\frac{1}{2} \text{ cm}^3$ $0,2\%$ zoutzuur.

Door deze inrichting der proeven kon ik nu beoordeelen in verschillende fasen der digestie, hoe het gesteld was met de stremmende werking bij neutrale reactie, bij zure reactie nadat de oplossing geneutraliseerd geweest was en bij zure reactie met en zonder toevoeging van NaCl. Voor de proteolytische werking kon ik dezelfde vergelijking maken. In kolom 2, 5, 8 en 11 ziet men weer hetzelfde als in tabel I; de leb werking bij neutrale reactie neemt gedurende de eerste 3 dagen af evenredig met de pepsinewerking bij zure reactie, onverschillig of er al dan niet NaCl is toegevoegd en of de oplossing eerst geneutraliseerd is geweest. Na 5 dagen digereeren houdt de evenredigheid van kolom 2 met kol. 8 en 11 op, met kol. 5 duurt ze nog voort.

Uit kolom 8 en 11 ziet men, dat het toegevoegde keukenzout de proteolytische werking ongeveer tot de helft vermindert, uit kolom 5 en 8, dat neutralisatie gedurende de eerste drie dagen geen anderen invloed op het digereerend enzym heeft, dan die welke afhankelijk is van het ontstaande keukenzout. Na 5 dagen digereeren, overeenkomstig de sterke vermindering van de stremmende werking, doet de neutralisatie zich ook op het digereerend enzym veel meer gevoelen. De verklaring, die ik bij tabel I gaf, geldt ook hier. Dat de termijn, gedurende welken het neutraliseeren weinig invloed heeft in de eerste reeks 6 dagen bedroeg en hier drie dagen, leidt tot de gevolgtrekking, dat in de hier gebruikte oplossing minder beschermende stof aanwezig was dan in de vorige.

Vergelijkt men nu ook de stremmende werking bij zure reactie in de verschillende fasen der digestie, dan ziet men zoowel bij de sterke (kol. 3, 6 en 9)

als bij de zwakkere concentratie (kol. 4, 7 en 10), dat de toevoeging van keukenzout den stollingstijd niet veel verandert, dat neutralisatie daarentegen de werking belangrijk vertraagt, wanneer het enzym eenigen tijd gedigereerd is. Dit stemt dus overeen met hetgeen voor de proteolytische werking werd gevonden.

Voor tabel III A zijn de proeven weer op dezelfde wijze ingericht als voor tabel II; alleen werd in kol. 4, 7 en 10 een sterker concentratie gebruikt. De uitkomsten zijn in overstemming met hetgeen te voren besproken werd.

Overeenkomstig de wijze, waarop *Schmidt Nielsen* zijne proeven inrichtte, werd een deel van dezelfde oplossing in ijs bewaard; hiervan werd telkens 5 cm³ geneutraliseerd met 2,6 cm³ $\frac{n}{10}$ NaOH oplossing en door toevoegen van 2,4 cm³ gedistilleerd water gebracht op een volume van 10 cm³ (kol. 13 B). Deze neutrale vloeistof werd dan met eene overeenkomstige keukenzoutoplossing 2, 3 en 6 maal verdund. (kol. 1) en voor de proeven gedeeltelijk weer aangezuurd en gebruikt in dezelfde verhoudingen als de geneutraliseerde gedigereerde oplossing, van tabel III A. Voor de proeven in kolom 6 tot 11 werd de enzym-oplossing in dezelfde verhouding verdund met 0,2% zoutzuur, en behandeld als de overeenkomstige gedigereerde enzym-oplossing. Bij vergelijking van tabel III A en B ziet men evenals in tabel I dat de neutralisatie weer veel grooter invloed heeft op het gedigereerde enzym, dan op het enzym in de verdunde oplossing, zoowel op de stremmende als op de proteolytische werking.

Een verschijnsel verdient nog nadere bespreking. Als de digestie lang geduurd heeft, en de tijden voor de stremming bij neutrale reactie zeer lang geworden zijn, ziet men dat de digestie-proeven met geneutrali-

seerde en weer aangezuurde enzym-oplossing naar verhouding te hooge cijfers geven (tabel II 8 Mei en vooral tabel III 3 Juni.) Dit laat zich wel verklaren.

De proteolyse is zeer gering en de oplossing van eiwit in de buisjes van Mett geeft dus hoogst waarschijnlijk niet geheel nauwkeurig de enzym-concentratie weer; eveneens zal de stremmingstijd bij zoo zwakke lebwerking allicht een te langen tijd vorderen. Door *Pawlow* is er reeds op gewezen dat men bij verdunde oplossingen in de stremming van melk en de oplossing van eiwit geen even gevoelige reacties heeft voor het aantoonen van de enzymconcentratie. Had ik fibrine gebruikt in plaats van buisjes met gestold kippeneiwit, dan zou de onevenredigheid waarschijnlijk nog meer in 't oog zijn gelopen. Men mag nu niet uit het oog verliezen, dat de geneutraliseerde oplossing voor de digestieproef weer werd aangezuurd; er verliepen nooit meer dan enkele minuten tusschen het bereiden der neutrale oplossing en het aanzuren; het is dus zeer waarschijnlijk, dat het aangezuurde enzym minder van den schadelijken invloed van het neutraliseeren ondervond dan het deel, dat voor de stremming bij neutrale reactie werd bestemd. Volgens *Fuld* ¹⁾ gaat immers aan de vernieling door alkali een reparabele stoornis vooraf.

Zoo kan ook verklaard worden dat *Schmidt Nielsen* uitkomsten verkreeg, die hem deden besluiten tot de dualiteit van pepsine en chymosine. Hij verdeelde eene geconcentreerde oplossing van kalfsmaag-enzym in twee deelen, het eene deel werd gedigereerd, het andere in ijs bewaard. Wanneer nu de gedigereerde-oplossing genoeg van haar stremmend vermogen bij neutrale reactie had verloren, werden beide oplossingen geneutraliseerd. De niet gedigereerde werd zooveel ver-

¹⁾ Ergebnisse der Physiologie 1e Jahrgang 1e Abtheilung, S. 50.

dund, dat zij in denzelfden tijd (4-6 uur) melk deed stollen, als de gedigereerde oplossing.

Van beide neutrale vloeistoffen werd dan een deel aangezuurd tot dezelfde aciditeit en het stollend vermogen met fibrinevlokken bepaald. Hij vond dan, dat de gedigereerde oplossing in veel korter tijd de fibrine oploste, dan de niet gedigereerde, en daaruit besluit hij, dat door de digestie meer leb werd vernield, dan pepsine.

Na hetgeen hierboven gezegd is, meen ik, dat dit zoo verklaard kan worden; het gedigereerde enzym wordt door neutraliseeren minder werkzaam, doch door daarop volgend aanzuren wordt nog een deel behouden, dat in staat is eene fibrinevlok in vrij korten tijd op te lossen, terwijl in de niet gedigereerde oplossing, waar het enzym door neutralisatie minder wordt geschaad, zoowel de stremmende, als de proteolytische werking door de verdunning in gelijke mate afnemen.

De juistheid dezer verklaring kan ik uit mijne cijfers aantoonen. Tabel III A en B, waar de proeven werden ingericht zooals die van *Schmidt Nielsen*, geeft ook dezelfde uitkomsten. Kiest men de getallen van 31 Mei, dan vindt men, dat de lebwering bij neutrale reactie ongeveer tot $\frac{1}{7}$ is afgenomen, wordt de oplossing weer aangezuurd, dan digereert zij 1,1. Volgens *Schmidt Nielsen* moet men dus de niet gedigereerde oplossing 7 keer verdunnen. Daarvoor kan men uit tab. III B de 6 malige verdunning nemen, hier was de stollingstijd 10 minuten, de digestie 0,49.

Volgens *Schmidt Nielsen* zou men dus concludeeren, dat de gedigereerde oplossing bij bijna gelijken stollings-tijd ruim 2 maal meer pepsine bevatte dan de verdunde. Vergelijkt men nu ook de getallen van kolom 11 A, dan ziet men, dat de pepsine-werking eigenlijk

niet 1,1, maar 4,2 bedroeg. Het getal 1.1 was slechts afhankelijk van het neutraliseeren. De verdenking rijst dus, of het getal 13 van kol. 2 A ook niet voor een groot deel is toe te schrijven aan de neutralisatie. Bij de verdunde oplossing is de invloed van het neutraliseeren kleiner (1,21 en 0,49) en zooals uit kol. 8 B blijkt bijna geheel te stellen op rekening van het ontstaande keukenzout, wat bij de gedigereerde oplossing niet het geval is. Ik besluit hier dus uit, dat men uit de werking der geneutraliseerde gedigereerde en der geneutraliseerde verdunde oplossing in het geheel geen conclusie mag trekken omtrent de afneming van het stremmend en digereerend enzym door digestie.

Gaat men omgekeerd te werk en maakt men de proteolytische werking der niet gedigereerde oplossing door verdunnen met zoutzuur gelijk aan die van de gedigereerde oplossing, dan vindt men het volgende: Op 31 Mei was het pepsine-gehalte tot de helft verminderd (kol. 11 A). Werd de niet gedigereerde oplossing 2 maal verdund met 0,2% zoutzuur, dan vond ik ook een digestie van 4,41 (kol. 11 B). In de gedigereerde en de verdunde oplossing is dus het pepsine-gehalte met zekerheid gelijk. In de overeenkomstige geneutraliseerde oplossingen vindt men voor de verdunde oplossing sterker digestie en stolling, dan voor de gedigereerde. Dat er geen evenredigheid is (voor de digestie is de verhouding $\frac{1}{2}$, voor de stolling $\frac{1}{4}$) schrijf ik, zooals ik reeds zeide, hieraan toe, dat de oplossing voor de stremmingsproef niet meer wordt aangezuurd, wat voor het gedigereerde enzym van meer beteekenis is dan voor het niet gedigereerde.

Hiermede meen ik dus aangetoond te hebben, dat *Schmidt Nielsen* niet heeft bewezen, dat pepsine en chymosine twee verschillende stoffen zijn.

TABEL IV.

1	2	3	4	5	6	7
Datum.	Genutrali- seerd met CaCO ₃ .	Na $\frac{1}{2}$ uur staan bij neutrale reactie.	Na $\frac{1}{2}$ uur staan bij zure reactie, daarna neutrali- seeren	Bij zure reactie $2 \times$ verdund met water.	Digestie in 5 uur.	Leb van van Hasselt.
8 Febr.	10 sec.	5 sec.		5 sec.	9,6	35 à 40 s.
12 "	10 "	10 à 15 "	10 sec.	10 "	5,3	35 "
13 "	15-20 "	15 - 20 "	15-20 "	10-15 "	5.	35 à 40 "
14 "	15-20 "	15 - 20 "	15-20 "	10 "	5,3½	40 "
16 "	10-15 "	15 - 20 "	15-20 "	10-15 "	3,6	35 "
18 "	25-30 "	20 - 30 "	30 "	15-20 "	2,56	35 "
19 "	25 "	25 - 35 "	20 "	15 "	3,2	30 - 35 "
20 "	30-40 "	35 - 55 "	25-30 "	20 "	3,2½	35 "
21 "	45-50 "	85 - 120 "	70 "	20-25 "	3,2	35 - 40 "
22 "	45 "	70 - 75 "	40 "	25 "	2,7½	40 "
23 "	50-75 "	80 - 160 "	60 "	25-30 "	2,1	40 "
25 "	100-130 "	3 - 6 min.	50 "	35 "	1,56	35 - 40 "
26 "	70-100 "	4½ "	2½ min.	30 "	1,32½	40 "
27 "	65-105 "	8 "	1 "	35 "	2,56	35 "
28 "	4½-9 m.	17-45 "	6 "	40 "	1,1½	35-40 "
1 Maart	8-22 "	44-48 "	13-20 "	65-80 "	0,81	35 - 40 "
2 "	22-25 "	>1 uur,		70-85 "	0,49	35 "
4 "				165-270 "		40 "
5 "	> 1 uur			150-160 "		40 "
7 "				4½-5½ m.	0,49	40 "
12 "				> 5 uur.	0,49	40 "
20 "					0,04	35 "

Ook voor het varkens-enzym heb ik onderzocht, welke verandering het stremmend en digereerend vermogen door digestie ondergaat. Daar ik uit het onderzoek over chymosine en parachymosine wist, dat varkens-enzym zeer gevoelig is voor neutraliseeren, ben ik hier op eenigszins andere wijze te werk gegaan.

Ik bereidde eene geconcentreerde oplossing van gezuiverd varkensenzym in 0,2% zoutzuur, en plaatste

ze in de broedstoof. Op verschillende tijden zooals tabel IV kolom 1 aangeeft, werd 10 cm^3 van de oplossing genomen en hiervan de digestie in 5 uur bepaald. (kol. 6). Voor de stremming bij zure reactie werd 1 cm^3 oplossing verdund met 1 cm^3 water, en als gewoonlijk na verwarming met 8 cm^3 melk gemengd. (kol. 5). In 3 andere buisjes werd elk 2 cm^3 afgemeten. Twee dezer buisjes werden met een kleine overmaat gepulveriseerd calcium-carbonaat geneutraliseerd; een er van werd 1 minuut in 't waterbad gezet en dan de melk er bij gegoten (kol. 2); het andere bleef na de neutralisatie $\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur staan, waarna het eveneens 1 minuut verwarmd werd en met melk voorzien. (kol. 3). Het derde buisje diende als contrôle en bleef $\frac{1}{2}$ uur bij kamertemperatuur staan, daarna werd het geneutraliseerd en na 1 minuut in 't waterbad met melk gemengd (kol. 4). Er werd altijd zorg voor gedragen, dat er juist 1 minuut verliep tusschen het toevoegen van CaCO_3 en het bijgieten der melk.

Evenals bij het kalfs-enzym werden alle proeven dubbel genomen. De buisjes met geneutraliseerde oplossing bevatten tweemaal zooveel enzym, als die waarmee de stolling bij zure reactie plaats vond. Daar het er alleen om gaat de relatieve vermindering van het enzym-gehalte uit de verhouding der tijden bij de verschillende bepalingen na te gaan en te vergelijken met de vermindering van het digereerend enzym, doet dit overigens niets ter zake. Uit tabel IV kon ik dus beoordeelen, het afnemen van het digereerend vermogen, van het stremmend vermogen bij zure en neutrale reactie en de verandering, die het enzym in verschillende fasen der digestie onderging door $\frac{1}{2}$ uur staan bij neutrale reactie.

Ter wille van het overzicht heb ik in kolom 6 aange-

geven, wanneer het digereerend enzym ongeveer tot $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$ enz. was afgenomen. Vergelijkt men op deze plaatsen de stollingstijden van kol. 5, dan ziet men, dat deze toenemen in te naasten bij omgekeerde evenredigheid met de getallen voor de digestie. Uit het geheele beloop van kol. 5 en 6 mag men dus besluiten, dat digereerende en stremmende werking bij zure reactie gelijkelijk afnemen. Van 1 Maart af houdt de evenredigheid op; men is hier weer gekomen aan de grens, waar de enzym-oplossing te zwak wordt om in de verhouding 2:8 met genoegzame nauwkeurigheid melk te doen stremmen, om de uitkomst te mogen vergelijken met hetgeen de digestieproef oplevert. Tegelijkertijd gaan de uitkomsten der beide stollingsproeven van elkaar verschillen.

De tijden, die werden gevonden voor het geneutraliseerde enzym vertoonden aanvankelijk eveneens evenredigheid met het afnemen van het digereerend enzym. De evenredigheid houdt hier echter eerder op, (kol. 2.) en op 5 Maart was het stremmend enzym bij neutrale reactie niet goed meer aan te toonen, bij zure reactie nog wel, terwijl er tevens nog goed waarneembare digestie plaats vond. Uit kol 3, ziet men, dat het enzym in den eersten tijd, als de oplossing nog geconcentreerd is, weinig verandert door $\frac{1}{2}$ uur staan bij neutrale reactie; hoe meer de concentratie afneemt des te grooter wordt de invloed van de neutrale reactie. Dat inderdaad in den invloed der neutrale reactie gedurende $\frac{1}{2}$ uur de oorzaak der verminderde werking is te zoeken, bewijzen de proeven, waarin het enzym na $\frac{1}{2}$ uur staan bij kamertemperatuur werd geneutraliseerd. (kol. 4). Neutraliseeren heeft in verdunde oplossingen een schadelijken invloed op de enzymwerking. Dit verklaart voldoende, waarom de stremmende werking bij neutrale reactie eerder

TABEL V.

1	2	3	4	5	6	7
Datum.	Genutraliseerd met CaCO_3 .	Na $\frac{1}{2}$ uur staan bij neutrale reactie.	Na $\frac{1}{2}$ uur staan bij zure reactie daarna neutraliseeren.	Zure reactie 2 $\times$ verd. met water.	Digestie in 5 uur.	Leb van van Hasselt.
A						
11 Febr.	5 sec.	5 sec		5 sec.	14,4	35 - 40 s.
14 "	5 "	15 "	5 sec.	5 "	10,5	40 "
16 "	5-10 "	10 "	10 "	5-10 "	6,5 $\frac{1}{2}$	35 "
19 "	10 "	10 "	10-15 "	10 "	4,4	30 - 35 "
20 "	15 "	20-40 "	30 "	10-15 "	5,7	35 "
21 "	25-50 "	35-70 "	30 "	15 "	4,4 $\frac{1}{2}$	35 - 40 "
22 "	30-35 "	65-95 "	55 "	15 "	5. —	40 "
23 "	30-40 "	30-40 "	35 "	20 "	3,24	40 "
25 "	40-85 "	60-130 "	50 "	25 "	3,61 $\frac{1}{2}$	35 - 40 "
26 "	60-70 "	2-4 min.	60 "	20-25 "	3,24	40 "
27 "	40-120 "	1 $\frac{1}{4}$ -1 $\frac{3}{4}$ "	40 "	25 "	1,96	35 "
28 "	60-65 "	> 1 uur.	65 "	25-30 "	3,24	35 - 40 "
1 Maart	1-4 $\frac{1}{2}$ min.	> 5 "	6 $\frac{1}{2}$ min.	40 "	1,69 $\frac{1}{2}$	35 - 40 "
2 "	2-3 $\frac{1}{4}$ "			35-40 "	1,69	35 "
4 "				80 "	1,1 $\frac{1}{18}$	40 "
5 "	> 1 uur			65-70 "	0,81	40 "
7 "				80 "	0,64	40 "
12 "				3 $\frac{1}{2}$ min		40 "
20 "				> 5 uur.	0,16	35 "
B.						
niet verd.	10 sec.	10 sec.				35 - 40 "
2 "	20 "	30 "				35 - 40 "
4 $\times$ "	35-40 "	45-70 "				35 - 40 "
8 $\times$ "	2 $\frac{1}{2}$ -4 min.	> 20 min.				35 - 40 "
16 $\times$ "	na 8 min. vlokkig.					35 - 40 "

onevenredig wordt met de proteolyse dan bij zure reactie en eerder geheel verdwijnt, dan de digereerende werking. Bewijzend voor het bestaan van een afzonderlijk enzym, dat bij neutrale reactie werkt, zooals *Hammarsten* zich voorstelde, is dit verschijnsel dus niet.

Bij het kalfsenzym vond ik, dat de nadeelige invloed van neutraliseeren met alkali op de gedigereerde oplossing moest worden toegeschreven aan de vernieling van eene stof, die het enzym beschermt. Bij het varkensenzym is bij neutralisatie met calcium-carbonaat een dergelijke stof niet in het spel.

Dit bewijst tabel V. Het eerste deel A is geheel ingericht als tabel IV. Een deel van de oplossing werd niet gedigereerd, maar in verschillende verhoudingen met 0,2% zoutzuur verdund: B. Van elke verdunning werd 2 cm³ direct na neutralisatie met melk gemengd, en 2 cm³ na 1/2 uur staan bij neutrale reactie. Men ziet hier precies hetzelfde als bij de gedigereerde oplossing; het enzym in de geconcentreerde oplossing ondervindt geen of weinig invloed van de neutrale reactie; hoe meer de oplossing verdund wordt, des te meer wordt de werking er door benadeeld. Daar de verdunde oplossing zich zoo geheel gelijk gedraagt als de gedigereerde kan men moeilijk blijven aannemen, dat door digestie eener enzym-oplossing meer leb dan pepsine vernield zou worden.

Om mij geheel te overtuigen heb ik de onderzoekingsmethode van *Schmidt Nielsen* eenigszins gewijzigd ook op het varkensenzym toegepast. Een oplossing, die na neutralisatie met CaCO₃ melk deed stremmen in 5 seconden, bij zure reactie 2 maal verdund met water, in 5 seconden en in 5 uur een digestie vertoonde van 11,56 werd gedeeltelijk in de stoof gedigereerd, gedeeltelijk bij lage temperatuur bewaard. Na 11 dagen digereeren was de stollingstijd van het met CaCO₃

geneutraliseerde enzym 30 seconden. Een hoeveelheid niet gedigereerde oplossing werd nu zooveel met 0,2% zoutzuur verdund, dat zij, geneutraliseerd, melk in denzelfden tijd deed stremmen. Van beide oplossingen werd nu ook de stremming bij zure reactie en de digestie bepaald:

	Gedig. opl.		Verdunde opl.	
Geneutraliseerd met CaCO_3 .	30 sec.	30 sec.	30 sec.	35 sec.
Zure reactie $2 \times$ verd. m. wat.,	25 "	20-25 "	25 "	30 "
Digestie in 5 uur.	1,4 m.m.		1,4 m.m.	

De proef leert, dat er na 11 dagen digereeren niet meer melkstremmend enzym is verloren gegaan, dan pepsine.

Een tweede proef, geheel op dezelfde wijze ingericht, gaf het volgende: de oplossing, waarvan werd uitgegaan, deed de melk stremmen in ongeveer 5 seconden na neutralisatie met CaCO_3 , bij zure reactie 2 maal verdund met water in minder dan 5 seconden; de digestie was in 5 uur 4,6 m.m. Een deel van de oplossing werd gedigereerd en na 11 dagen vergeleken met het gedeelte, dat bij lage temperatuur was bewaard en ongeveer 5 maal verdund met 0,2% zoutzuur:

	Gedig. opl.		Verdunde opl.	
Geneutraliseerd met CaCO_3 .	25 sec.	30-35 sec.	30 sec.	30-35 sec.
Zure reactie $2 \times$ verd. m. wat.,	15 "		20 "	15-20 "
Digestie in 5 uur.	2 m.m.		1,9 m.m.	

De oplossing werd verder gedigereerd. Na 19 dagen kon ik met geneutraliseerd enzym den stollingstijd niet goed meer bepalen. In enkele proeven ontstond stremming na eenige minuten, in andere nog niet in 10 minuten. Bij zure reactie werkte ze nog goed. De niet gedigereerde oplossing werd nu met zoutzuur zooveel

(11 maal) verdund, dat zij bij zure reactie in denzelfden tijd melk deed stremmen als de gedigereerde.

	Gedig. opl.	Verdunde opl.
Zure reactie $2 \times$ verd. m. wat., Digestie in 5 uur.	35 sec. 35 sec. 1,9 m m.	35à40 sec 40 sec. 1,9 m.m.

Dat in deze proef bij langer stollingstijd ongeveer dezelfde digestie werd gevonden als bij de bepaling na 11 dagen digereeren, mag hieraan worden toegeschreven, dat bij de laatste andere, versch gemaakte eiwitbuisjes werden gebruikt.

Pawlow had dus wel gelijk, toen hij beweerde, dat de methode van *Hammarsten*, om door digestie met zoutzuur levrij pepsine-oplossingen te bereiden, slechts schijnbaar haar doel bereikt en dat men in het neutraliseeren de oorzaak van de vermeende scheiding der enzymen heeft te zoeken. Hoe het mogelijk was, dat de neutralisatie tot deze verkeerde voorstelling aanleiding gaf, daar is hij niet nader op ingegaan. Dit is naar ik meen uit boven vermeld onderzoek duidelijk geworden.

Conclusies.

De resultaten van mijn werk kunnen ten slotte in de volgende besluiten worden samengevat:

1^o. Het door *Bang* ontdekte onderscheid tusschen chymosine en parachymosine berust niet op verschillende eigenschappen dezer enzymen, maar op de aanwezigheid van eene stof, die de chymosine verontreinigt en in de parachymosine niet of in veel geringer mate voorkomt. Door reiniging kan men uit chymosine een

enzym bereiden, dat de eigenschappen van parachymosine bezit of althans sterk daartoe nadert.

2°. De onderstelling van *Bang*, dat men door verhitten der enzymoplossing tot 70° kan bewijzen, dat parachymosine en pepsine twee verschillende stoffen zijn, is niet juist. Integendeel pleit de gelijke invloed van verhitten en van de werking van 0,01% alkali gedurende $\frac{1}{2}$ uur op het stremmend en digereerend vermogen der oplossing voor de eenheid van proteolytisch en stremmend enzym.

3°. Wanneer het enzym door dialyse uit eene zure oplossing wordt geprecipiteerd, is in het neerslag geen verandering in de verhouding van digereerende en stremmende werking waar te nemen.

4°. Door kippeneiwit wordt zoowel het proteolytisch als het melkstremmend enzym in gelijke mate geabsorbeerd.

5°. De door mij onderzochte praeparaten, die wel melk doen stremmen, doch geen eiwit oplossen, ontleenen deze eigenaardigheid aan bijmengselen, die de proteolyse storen.

6°. Noch door *Hammarsten*, noch door *Schmidt Nielsen* is bewezen, dat men door digestie met zoutzuur levrij pepsine-oplossingen kan maken. Zoowel de wijze waarop de beide werkingen afnemen, als de gelijke invloed van neutraliseeren op beide functies wijzen er veeleer op, dat pepsine en leb een en dezelfde stof zijn.

Een positief bewijs voor de identiteit van pepsine en leb heb ik niet geleverd.

Het door *Hemmeter* ¹⁾ tegen *Pawlow's* onderzoek geopperde bezwaar, dat het mogelijk is, dat twee

¹⁾ Are the proteolytic and milkcoagulating effects of gastric and pancreatic juice due to one and the same enzyme? Berliner klin. Wochenschr. Festnummer f. C. A. Ewald 1905, S. 14.

dooreengemengde stoffen zich tegenover allerlei verschillende invloeden zoo volkomen gelijk gedragen, dat de verhouding hunner werkzaamheid steeds dezelfde blijft, kan ook tegen mijne proeven ingebracht worden. Een bewijs voor de eenheid, zooals *Hemmeter* wenscht, kan echter feitelijk niet geeischt worden. Men kan uit maagslijmvliesen eene stof bereiden, die eiwit oplost en melk doet stremmen. A priori bestaat er geen reden te denken, dat dit een mengsel is van twee stoffen. Eerst toen *Hammarsten* meende, dat het mogelijk was deze stof te scheiden in twee, die elk afzonderlijk een der functien vertegenwoordigden, ontstond de meening, dat leb een andere stof was dan pepsine. *Pawlow* heeft aangetoond, dat het niet gelukt eene splitsing te weeg te brengen, noch door praecipitatie met magnesium-carbonaat volgens *Hammarsten*, noch met de door andere onderzoekers gevolgde methoden. Hij vermoedt, dat de schijnbare splitsing door digestie met zoutzuur is toe te schrijven aan het neutraliseeren. Dat dit zoo is, heb ik hier boven aangetoond.

Zoolang er geen deugdelijk bewijs is geleverd, dat de spitsing wel gelukt, zoolang is er geen reden om te onderstellen, dat pepsine en leb twee verschillende stoffen zijn.

Na het onderzoek van *Spiro*, *Petry*, *Fuld* en van *Herwerden* omtrent de caseine-splitsende werking van leb bij neutrale reactie, staan aan de onderstelling van *Sawjalow*, dat de maagklieren één enzym voortbrengen, dat in staat is bij lichaamstemperatuur en zure reactie eene hydrolytische spitsing van eiwitstoffen te weeg te brengen en bij neutrale reactie het caseine-molecule te doen uiteenvallen in splitsingsproducten, waarvan een deel zich met calcium verbindt tot het onoplosbare kaasstolsel, geen ernstige bezwaren meer in den weg.

TABEL I.

1	2	3	4	5	6	7
A	Genentraliseerd enzym		Zuur enzym.		Neutralisatie.	Leb v. Hasselt
	Datum.	Stolling.	Digestie. 9 cm ³ + 1 cm ³ 2 % HCl.	Digestie. Verdund met zoutzuur.	Digestie. Verdund met HCl + NaCl.	Stolling.
	14 April.	2 ⁵ / ₁₂ minuten	7,84	15,21	20 cm ³ + 10,7 ⁿ / ₁₀ NaOH + 9,3 H ² O	40 seconden
	15 "	4 ¹ / ₆ "			2 ¹ / ₂ " + 1,3 " + 1,2 "	
	16 "	8 ¹ / ₂ "			2 ¹ / ₂ " + 1,3 " + 1,2 "	
	17 "	5 ¹ / ₂ "	4	4,41	20 " + 10,6 " + 9,4 "	35 "
	18 "	5 ¹ / ₂ "			2 ¹ / ₂ " + 1,3 " + 1,2 "	35 à 40 "
	19 "	6 ¹ / ₆ "		3,61	2 ¹ / ₂ " + 1,3 " + 1,2 "	30 à 35 "
	20 "	6 "	2,25	3,61	10 " + 5,2 " + 4,8 "	40 "
	22 "	24—26 "	0,36	2,89	10 " + 5,2 " + 4,8 "	30 à 35 "
	23 "	45 "	0,16	2,25	10 " + 5,2 " + 4,8 "	30 "
				1,44		
B.		12 ¹ / ₂ "	1	2,89	10 " + 5,3 " + 4,7 "	35 "
				1,44		

TABEL II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Datum.	Geneutraliseerd enzym.				Zuur enzym. 2 × verd. met NaCl opl.			Zuur enzym.			Leb van van Hasselt.	Neutralisatie.
	2 cM ³ Stolling.	Aangezuurd tot 0,1% HCl. 2 cM ³ Stolling.	0,4 cM ³ + 1,6 cM ³ w. Stolling.	9cm ³ + 1cM ³ 2% HCl Digestie.	2 cM ³ Stolling.	0,4 cM ³ + 1,6 cM ³ w. Stolling.	9 cM ³ + 1/2 cM ³ 2 % HCl + 1/2 cM ³ 0,2 % HCl. Digestie.	1 cM ³ + 1 cM ³ w Stolling.	0,2 cM ³ + 1,8 cM w. Stolling.	4 1/2 cM ³ + 5 1/2 cM ³ 0,2 % HCl. Digestie.		
1 Mei	1 min.	5 sec.	3 1/8 m.	12,25	5 sec.	2 1/6 m.	14,44	5 sec.	1 2/3 m.	32,49	35 sec.	10 cM ³ + 5,3 NaOH + 4,7 water
3 "	2 1/6 "	10 "	8 1/2 "	5,76	5 "	5 1/2 "	6,76	5 "	5 "	11,56	35 "	10 " + 5,3 " + 4,7 "
4 "	3 1/4 "	10 "	12 1/2 "	4,84	5 à 10 "	7 1/2 - 9 "	5,76	5 à 10 "	8 "	10,89	40 "	10 " + 5,3 " + 4,7 "
6 "	12 1/2 "	20 "	> 90	1,21	10 "	25-29 "	4	10 "	34-37 "	6,76	40 "	10 " + 5,3 " + 4,7 "
7 "	8 "	15 "		1,69	10 "		2,89	10 "		7,29	35 "	10 " + 5,3 " + 4,7 "
8 "	53-60 "	30 "		0,64	10 "		2,25	15 "		4	40 "	10 " + 5,3 " + 4,7 "

TABEL III.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13													
A	Geneutraliseerd enzym.				Zuur enzym. 2 $\times$ verd. met NaCl opl.			Zuur enzym.			Leb van van Hasselt.	Neutralisatie.													
	Datum.	2 cM ³ Stolling.	Aangezuurd tot tot 0,1% HCl.		2 cM ³ Stolling.	0,8 cM ³ + 1,2 cM ³ w. Stolling.	9 cM ³ + $\frac{1}{2}$ 2 $\frac{0}{0}$ HCl + $\frac{1}{3}$ cM ³ 0,2 $\frac{0}{0}$ HCl. Digestie.	1 cM ³ + 1 cM ³ w. Stolling.	0,4 cM ³ + 1,6 cM ³ w. Stolling.	4 $\frac{1}{2}$ cM ³ + 5 $\frac{1}{2}$ cM ³ . 0,2 $\frac{0}{0}$ HCl. Digestie.															
			2 cM ³ Stolling.	0,8 cM ³ + 1,2 cM ³ w. Stolling.																					
29 Mei	1 $\frac{5}{6}$ m.	5 à 10 sec.	1 $\frac{2}{3}$ m.	4,62	10 sec.	1 $\frac{5}{12}$ min.	7,29	10 sec.	1 $\frac{1}{6}$ min.	9	40 à 50 sec.	10 cM ³ + 5,2 cM ³ $\frac{n}{10}$ NaOH + 4,8 w.													
30 "	6 "	20 "	4 $\frac{2}{3}$ "	4	15 "	2 $\frac{1}{2}$ "	4,84	15 "	3 "	7,29	50 "	10 " + 5,2 " " + 4,8 "													
31 "	13 "	25 "	8 $\frac{1}{2}$ "	1,1	15 "	3 $\frac{1}{2}$ "	3,24	15 "	4 $\frac{1}{4}$ "	4,2	50 "	10 " + 5,2 " " + 4,8 "													
1 Juni	25-29 "	30 "	12 $\frac{1}{2}$ "	0,94	20 "	4 $\frac{1}{2}$ "	1,69	20 "	5 $\frac{1}{2}$ "	2,78	50 "	10 " + 5,2 " " + 4,8 "													
2 "	45 "	25 "	16-17 "	0,36	15 "	3 $\frac{3}{4}$ "	2,1	15 "	5 $\frac{3}{4}$ "	2,89	45 à 50 "	10 " + 5,2 " " + 4,8 "													
3 "	> 2 u.	55 "	40-53 "	0,13	25-30 "	11 "	0,81	25 "	11 "	1,21	45 à 50 "	10 " + 5,2 " " + 4,8 "													
B.	niet verd.	1 $\frac{5}{6}$ m.	5 à 10 sec.	1 $\frac{2}{3}$ m.	10 sec.	1 $\frac{5}{12}$ min.	7,29	10 sec.	1 $\frac{1}{6}$ min.	9	45 à 50 s.	5 cM ³ + 2,6 cM ³ $\frac{n}{10}$ NaOH + 2,4 w.													
													2 $\times$ "	3 $\frac{1}{2}$ "	20 "	3 $\frac{1}{2}$ "	2,25	15 "	2 $\frac{1}{6}$ "	2,89	15 "	2 $\frac{1}{3}$ "	4,41	50 "	5 " + 2,6 " " + 2,4 "
3 $\times$ "	5 $\frac{1}{4}$ "	30 "	5 "	1,96	20 "	3 $\frac{1}{2}$ "	1,56	20 "	4 "	3,24	50 "	5 " + 2,6 " " + 2,4 "													
6 $\times$ "	10 "	50 "	11 "	0,49	40 "	7 "	0,64	35 "	6-6 $\frac{1}{2}$ "	1,21	45 à 50 "	5 " + 2,6 " " + 2,4 "													

STELLINGEN.

1. De stremming van caseïne door leb berust op digestie.
2. Gastro-enterostomie is eene causale therapie bij ulcus ventriculi.
3. Bij Peritonitis exsudativa tuberculosa verrichte men laparotomie, doch niet voordat het exsudaat lang heeft bestaan.
4. De constipeerende invloed van morphine is hoofdzakelijk toe te schrijven aan den invloed van het vergif op de maag.
5. Tijdens de zwangerschap wordt het onderste uterussegment gevormd, grootendeels uit de cervix uteri.
6. Bij entropion cicatricium verrichte men geene incisie in den tarsus.
7. De Uberrumpelungs methode verdient bij de behandeling van vele hysterische toestanden aanbeveling.
8. Het eten van rauwe eieren, afkomstig uit eene omgeving, waar typhus heerscht, is gevaarlijk

9. De glandula pituitaria bevat eene stof, die specifiek diuretisch werkt.
 10. Anthracose der longen ontstaat niet door opnemen van kooldeeltjes uit den darm.
 11. Er bestaan intracranieele vasodilatatoren voor de hersenvaten, die afhankelijk zijn van een deel der hersenen, dat proximaal van de medulla oblongata gelegen is.
 12. Er bestaan geen vrije uiteinden van neurofibrillen.
 13. De zenuwvezelen, die uitgaan van de verschillende gebieden van de retina begeven zich niet naar afzonderlijke gebieden in de cortex.
-

