

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

Over de enzymen van het stremsel.

DOOR

DR. W. VAN DAM.

In eene vorige verhandeling ¹⁾ heb ik er reeds op gewezen, dat in den laatsten tijd verschillende onderzoekingen zijn uitgevoerd, om uit te maken of het melk coaguleerend enzym, de chymosine, al of niet identisch is met het proteolytisch werkende ferment, de pepsine, uit het maagsap. Ook werd reeds aangehaald een onderzoek van Petry ²⁾ die in leb nog een bijzonder, specifiek voor caseïne, proteolytisch enzym meent gevonden te hebben. Bedenken we nu verder, dat, volgens Bang ³⁾, nog een vierde enzym zou bestaan, parachymosine, eveneens met coaguleerende eigenschappen, echter in verschillende opzichten afwijkend van de chymosine, dan is het duidelijk, dat we bij de bestudeering van de eigenschappen van stremsel voor een zeer ingewikkeld probleem staan. In hoeverre door de jongste onderzoekingen daarin vereenvoudiging gebracht is, kan alleen blijken door eene korte uiteenzetting ⁴⁾ vooraf te doen gaan van de meeningen, die tot voor korten tijd over de kwestie bestonden. De reeds in 1872 door Hammarsten verrichte onderzoekingen, die gevoerd hebben tot de onderscheiding van een coaguleerend en een verterend werkend enzym, zijn, althans wat de uitkomst betreft, van algemeene bekendheid. Het gelukte hem, door een en dezelfde oplossing van kalfsmaagextract op twee verschillende wijzen te behandelen, in het eene geval een goed stremmende, maar niet proteolytisch werkende vloeistof, in het andere geval een vocht met juist de omgekeerde eigenschappen te verkrijgen. Niettegenstaande deze zeer overtuigende uitkomsten, begon bij verschillende physiologen twijfel te ontstaan aan de dualiteit der beide enzymen, waartoe de bevinding aanleiding gaf, dat men altijd naast de eene werking, ook de andere waarnam. Zoo vond men zelfs, dat extracten van plantaardigen oorsprong, van kippen en vischmagen enz., waarbij van het met melk in aanraking

¹⁾ Deze Verslagen No. VII.

²⁾ Hofmeisters Beiträge, Bd. VIII, 386.

³⁾ Bang. Pflügers Archiv., Bd. 79, 425.

⁴⁾ Gedeeltelijk ontleend aan een artikel van Gewin in Zeitschr. f. Physiol. Ch., Bd. 54, 32.

komen geen sprake is, in staat bleken, melk tot stolling te brengen. Pekelharing ¹⁾, die er in slaagde het extract van kalfsmagen van veel verontreinigingen te bevrijden, vond, dat pepsine ook na langdurige verwarming met verdund zoutzuur en na reiniging, in staat is, bij neutrale reactie, melk te doen stollen. Hierdoor werd als het ware de aanval op de dualistische theorie geopend. Nencki en Sieber ²⁾ kwamen de uitkomsten van Pekelharing bevestigen en stelden de hypothese op, dat we in de pepsine een zeer groot molecule zouden te zien hebben met zijketens, waarvan de eene bij zure reactie eiwit zou splitsen, de andere bij neutrale reactie melk zou doen coaguleeren. In eene kort daarna verschenen verhandeling van Pawlow en Parastschuk ³⁾ ging men een stap verder en meende, dat men geen twee verschillende atoomgroepen in het pepsinmolecule behoefde aan te nemen, maar de vertering van eiwit en de kaasvorming aan eene en dezelfde stof te moeten toeschrijven, die onder verschillende omstandigheden werkt. Toen kwam tenslotte Sawjalow ⁴⁾ voor den dag met de meening, dat de stremming niets anders zou zijn dan het gevolg van de beginnende vertering der kaasstof; Hammarsten's weiproteïne, die bij de stremming optreedt, zou dus dan als verteringsproduct te beschouwen zijn.

Hierop volgde eene krachtige verdediging van de dualistische opvatting door Schmidt-Nielsen ⁵⁾; de proeven die hij voor zijne meening aanvoerde waren in zekeren zin eene variatie van hetgeen Hammarsten vroeger verricht had en schenen wel zeer overtuigend. Zijne werkwijze kwam op het volgende neer. De lebklieren van kalfsmagen werden bij lage temperatuur met HCl van 0,2% uitgetrokken en met zoutzuur van dezelfde sterkte verdund tot de gewenschte concentratie. Nu werd een deel der oplossing bij lichaamstemperatuur gedigereerd, waarbij, zooals door Hammarsten gevonden was, de stollingstijd veel sterker vermeerderd dan met de teruggang van het vermogen om kippen-eiwit te verteren overeenkomt.

B.v. Vóór de verwarming: Stoltijd 60". Volgens Mett ⁶⁾ 5 m.M.

Na de verwarming: Stoltijd 6 uren. Volgens Mett 3 m.M.

Naar het coaguleerend ferment beoordeeld is dus de oplossing $6 \times 60 = 360$ maal zwakker geworden; volgens het verterend vermogen slechts $\frac{52}{31} =$ ongeveer 3 maal. Hier was dus de chymosine bijna totaal vernield, de pepsine slechts weinig aangetast. Schmidt-Nielsen neutraliseerde nu voorzichtig de beide oplossingen en verdunde de niet verwarmde zoo sterk met water,

1) Z. f. physiol. Ch., Bd. 22, 233.

2) " " " " " 32, 291.

3) " " " " " 42, 415.

4) " " " " " 46, 307.

5) Z. f. physiol. Ch., Bd. 43, 92.

6) Zie hiervoor: Onderzoekingen over het Edammerkaasrijpingsproces. Deze verslagen N^o. VII.

dat de stremtijd gelijk werd aan dien van de gedigereerde vloeistof, voor het boven aangenomen geval dus 6 uren. Deze beide vloeistoffen liet hij nu, na aanzuren tot 1 ‰ HCl op fibrine werken en ook op melk, waaraan van te voren eenig zoutzuur (4 ‰) was toegevoegd. Hij kreeg daarbij de volgende uitkomsten.

	Verw. opl.	Verdunde, niet verw. opl.
Stremming van neutr. melk	370 min.	355 min.
" " aangezuurde melk	6 "	215 "
Fibrinevertering	3 uren.	80 uren.

Dit is een van de voorbeelden, die Schmidt—Nielsen opgeeft. De eenig mogelijke verklaring scheen nu deze, dat de sterke vermindering van den stremtijd bij het aanzuren der melk een gevolg was van het in werking treden van de pepsine, die in de neutrale melk onwerkzaam zou zijn, maar bij zure reactie ook coaguleerend zou gaan werken. Bij de verdunde oplossing is daarentegen de verkorting van den stremtijd veel geringer, want hier is het pepsinegehalte zeer sterk verkleind, zooals blijkt uit de vertering in 80 uren tegen 3 uren vóór de verwarmde oplossing. Zooals gezegd, deze proeven met zoo enorme verschillen wijzen wel op dualiteit van de enzymen, hoewel bij de bestudeering van het onderwerp juist het gedwongen zijn, om ook aan de pepsine coaguleerende eigenschappen toe te kennen, me een zwak punt heeft toegeschenen.

Ook door Bang ¹⁾ werd de oude opvatting verdedigd en zooals reeds gezegd werd, deze schrijver meende zelfs naast pepsine en chymosine nog een derde enzym aangetoond te hebben, dat hij parachymosine noemde.

Verder leverde nog eene belangrijke bijdrage Sch rump f ²⁾, die uit uitgeperst maagsap eene oplossing bereidde, die sterk verterend, maar niet stremmend werkte; zoo zouden nog meer onderzoekers te noemen zijn.

Hoe overtuigend al het gevondene ook scheen te moeten werken, voor hen, die in pepsine en chymosine hetzelfde enzym meenden te moeten zien, had het geen bewijzende kracht voor de dualiteit, want het was gebleken, dat door verontreinigingen op de enzymwerking op verschillende wijzen invloed werd uitgeoefend en de door bovengenoemde onderzoekers gebruikte oplossingen bevatten alle in ruime mate deze bijmengselen. Deze overweging gaf Gewin ³⁾ aanleiding tot een zeer uitvoerig onderzoek, waarbij de invloed der verontreinigingen werd nagegaan en zijne uitkomsten hebben verschillende nog duistere punten opgehelderd, o.a. de kwestie van de parachymosine van Bang, waarvan reeds boven sprake was. In verband met mijne eigene onderzoekingen kom ik nog op Gewin's arbeid terug, maar ik kan al dadelijk op-

¹⁾ l. c.

²⁾ Hofmeisters Beitrage. Bd. VI, 396.

³⁾ l. c.

merken, dat door hem werd aangetoond, dat er geen reden bestaat, om met Bang een bijzonder enzym aan te nemen, zoodat er van de vier hierboven genoemde enzymen in het stremsel nog twee overblijven. De conclusie, die Gewin uit zijn onderzoek trok was echter, dat ook deze beide één en hetzelfde ferment waren, waarvan de werking verschilt naarmate er verontreinigingen mee vermengd zijn.

Ongeveer gelijktijdig met de verhandeling van Gewin verscheen nog een artikel van Sawitsch ¹⁾, die eveneens concludeert tot de identiteit van pepsine en chymosine. Daarop publiceerde Hammarsten ²⁾ in 1908 een zeer uitvoerig onderzoek, dat gedeeltelijk eene bevestiging was van zijne vroegere mededeelingen en verschillende nieuwe argumenten bracht voor de dualistische opvatting. En niet alleen was hij niet overtuigd door de onderzoekingen van Sawitsch en Gewin, maar hij meende zelfs in het werk van laatstgenoemden schrijver overeenkomst te zien met zijne eigene uitkomsten, zoodat hij met Gewins conclusie niet kon meegaan.

In dit stadium verkeerde de polemiëk over het onderwerp, toen ik me door mijne onderzoekingen over de rol, die het stremsel bij het kaasrijpingsproces speelt, genoodzaakt zag eene poging te doen, een beter inzicht te krijgen in de kwestie. Daartoe heb ik in de eerste plaats de onderzoekingen verricht, die in mijne laatste verhandeling zijn opgenomen, over de werking van stremsel op kaasstof ³⁾. Voor verschillende stremfels vond ik volkomen evenredigheid voor vertering van de kaasstof en het stremmend vermogen, een uitkomst dus, welke met de unitaire opvatting overeenkomt. Voor door mijzelf bereid kalfsmaagextract (volgens Hammarsten) vond ik, voor het geval, dat door digestie met HCl 0,2 % het stremmend vermogen was opgeheven, de verterende werking op kaasstof wel is waar grootendeels, doch niet geheel verdwenen: ongeveer $\frac{1}{10}$ van de oorspronkelijke verterende kracht bleef bestaan, tegen het bijna geheel verloren gaan van het stremvermogen. Deze uitkomst heb ik aan kleine hoeveelheden pepsine in het stremsel toegeschreven op grond van mijne proeven met gezuiverde pepsine (volgens Pekelharing) waarvan het eerste gedeelte in de genoemde verhandeling reeds is opgenomen. De voortzetting dezer proeven heeft geleid tot de waarneming van verschijnselen, die van belang zijn gebleken voor de beantwoording der vraag over de identiteit van het conguleerende en verterende enzym. Hier volgen mijne uitkomsten.

Wanneer men gereinigde varkenspepsine ⁴⁾, opgelost in HCl 0,2 % tot eene zoodanige concentratie als door Hammarsten

¹⁾ Z. für physiol. Ch., Bd. 55, 84.

²⁾ Deze "verlagen" N^o. VII. 56, 18.

³⁾ Deze "verlagen" N^o. VII.

⁴⁾ De vrij groote hoeveelheden van dit gezuiverde preparaat, die voor mijn onderzoek noodig waren, heb ik te danken aan de welwillendheid van prof. Pekelharing te Utrecht wien ik ook hier mijn vriendelijken dank daarvoor betuig.

bij zijne proeven met kalfsmaagextract werd gebruikt, geruimen tijd bij temperaturen van 37° — 47° C. houdt, verdwijnt langzamerhand het vermogen om te stremmen, terwijl kippeneiwit nog krachtig wordt verteerd. In dit opzicht vond ik dus geen verschil met de uitkomsten van Hammarsten. Zoo vond ik b.v. voor de verwarmde oplossing na $6\frac{1}{2}$ uur nog geene stremming tegen $60''$ voor de niet verwarmde, terwijl volgens Mett ¹⁾ verteerd werden 2,7 en 4,2 m.M. Ook deze proef, met zooveel mogelijk gereinigd enzym, bleek dus een krachtig bewijs voor de dualiteit, want hier kon de verontreiniging van de oplossing niet als verklaring worden aangehaald voor het uiteengaan der beide werkingen. Toch was de mogelijkheid niet uitgesloten, dat de door het digereeren ontstane albumosen (door de vernietiging van een deel van het enzym) oorzaak waren van het verdwijnen van het stremmend vermogen. Om dit na te gaan werd opnieuw, maar thans in ruimer hoeveelheid, eene portie van het gereinigde enzym met HCl 0,2 % zoo lang verwarmd, dat de oplossing niet meer stremmend werkte.

360 m.Gr. van het enzympoeder werden voorzichtig in 780 c.M³. HCl 0,2 % opgelost en zoo lang verwarmd, dat 1 c.M³., vermengd met 20 c.M³. melk bij 37° C. na 4 uren 50 minuten begin van stolling gaf. De niet verwarmde oplossing stremde onder dezelfde omstandigheden in 86 seconden. Vertering volgens Mett in 2 uur: 2,0 en 3,8 m.M. De verwarmde vloeistof (ongeveer 700 c.M³.) werd nu in eene dialyseering gedurende 24 uren tegen regenwater gedialyseerd; de vloeistof werd daarbij een weinig troebel, de reactie tegenover lakmoes was zwak zuur. Toen werd 30 à 40 % $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, dat van te voren door omkristalliseeren van sporen ijzer bevrijd was, in substantie toegevoegd. Na 2×24 uren staan werd de heldere oplossing afgegoten en het ontstane neerslag gefiltreerd, tusschen filtreerpapier uitgeperst, in 15 c.M³. HCl 0,2 % opgelost, en 2×24 uren tegen herhaaldelijk ververscht HCl 0,2 % in een dialyseerhulsje gedialyseerd. De zoo verkregen oplossing, die weer krachtig stremmend bleek te werken, werd door verdunning met HCl 0,2 % op die sterkte gebracht, dat ze even sterk stremde als de oorspronkelijke, niet verwarmde oplossing, n.l. $122''$ en $118''$. Volgens Mett werd toen gevonden voor beide vloeistoffen 4,0 m.M. in 3 uren. Na de reiniging zien we dus het stremmend vermogen weer terugkeeren.

Uit deze proef trek ik het besluit, dat door de verwarming met zoutzuur, het coaguleerende enzym niet wordt vernietigd, maar door verontreinigingen of een of andere verandering in zijn stremmende werking wordt geremd.

Met het oog op het belang van deze uitkomst voor de vraag naar de identiteit van pepsine en chymosine herhaalde ik de proef met eene nieuwe zending enzym. Bij de bepaling van de sterkte van dit preparaat deed ik nu de volgende waarneming.

¹⁾ Zie hiervoor: Onderzoekingen over het Edammerkaasrijpingsproces. Deze verslagen.

15 m.Gr. van het poeder werden in 15 c.M³. HCl 0,2 % opgelost en 1 deel met 2 deelen water verdund; 1 c.M³ van deze zure oplossing deed 10 c.M³. melk bij 37° C. in 65 seconden stollen. Toen ik echter 1 c.M³. met 20 c.M³. melk vermengde, stremden deze nog niet in 10 minuten. In het laatste geval was de reëele zuurgraad van het mengsel natuurlijk kleiner dan in het eerste, maar op grond van metingen, die ik vroeger verrichtte¹⁾, kan dit verschil onmogelijk zoo groot zijn, dat het den stremtijd van 10 minuten deed verwachten. Hier moest dus naar een andere oorzaak worden gezocht. Gewin had bij zijn reeds aangehaald onderzoek gevonden, dat de gereinigde varkenspepsine uitermate gevoelig is voor alkali en hij wees er uitdrukkelijk op, dat zelfs neutrale reactie niet geheel onschadelijk is. Nu wijkt volgens mijne vroegere metingen²⁾ de reactie van de melk niet veel af van de neutrale en ik redeneerde dus als volgt: de melk bevat hydroxylionen; is het misschien mogelijk, dat deze geringe hoeveelheid voldoende is, om bij 37° C., waarbij gewoonlijk wordt gewerkt, gedurende de stremproef het enzym gedeeltelijk te vernietigen? Wanneer dit het geval was, dan zou ook de groote invloed van de kleine hoeveelheid zuur begrijpelijk worden, want juist in de nabijheid van het neutrale punt veroorzaakt een kleine quantiteit zuur een groote *relatieve* vermeerdering der H-ionen, resp. vermindering der OH-ionen. En nu redeneerde ik verder: wanneer dat zoo is, dan moet de vernietigende werking des te sterker zijn naarmate de temperatuur hooger is. Bepaalt men dus de verhouding der stremtijden voor twee monsters melk, die in OH-ionengehalte slechts weinig verschillen, dan moet bij verschillende temperaturen niet dezelfde verhouding gevonden worden.

1 c.M³. van de enzymoplossing (15 m.Gr. per 15 c.M³. HCl 0,2 %) werd in het eene geval met 2 c.M³. HCl 0,2 %, in het andere met 1 c.M³. HCl 0,2 % en 1 c.M³. water verdund. Voor deze oplossingen, die dus 0,2 % en 0,13 % HCl bevatten, werden de stremtijden (1:20) bij 37,5° C. en 25,5° C. bepaald.

Bij 37,5° C. 97" voor de eerste tegen 220" voor de 2de enzymoplossing.

Bij 25,5° C. 5'20" voor de eerste tegen 6'54" voor de 2de enzymoplossing.

De uitslag dezer proef is niet twijfelachtig en ik kan dien niet anders verklaren, dan door de gedeeltelijke vernieling van het enzym bij hoogere temperatuur.

Eene tweede proef, waarbij ook met 2 deelen water werd verdund gaf het volgende:

- Bij 37,5° C. 1. 1 c.M³. + 2 c.M³. HCl 0,2 %, daarvan 1 c.M³. + 20 melk 46".
 2. 1 c.M³. + 1 c.M³. HCl 0,2 % + 1 c.M³. water, daarvan 1 + 20 melk 79".
 3. 1 c.M³. + 2 c.M³. water, daarvan 1 c.M³. + 20 melk 178".

¹⁾ Onderzoekingen over de lebstremming. Deze verslagen V.

²⁾ l. c.

Bij 25,5° C., 1. 156", 2. 201" en 3. 273".

Dat hier de met twee deelen water verdunde oplossing in 4 à 5 minuten stremde, terwijl met andere melk in 10 minuten nog geene stremming intrad, is misschien zoo te verklaren, dat de aciditeit van de eerste lager was; titreerende vond ik n.l. 16,0 tegen 19,2 zuurgraden voor het laatste geval. (Voor de bepaling van den reëlen zuurgraad had ik geene gelegenheid).

Hieruit kon dus de volgende conclusie getrokken worden:

Voor de gereinigde varkenspepsine is de bij lichaamstemperatuur gevonden stremtijd geene maat voor de hoeveelheid coaguleerend enzym.

Het spreekt wel van zelf, dat men, door geene rekening te houden met dit verschijnsel, tot de meest zonderlinge gevolgtrekkingen komt. Gewin toonde aan, dat het gereinigde varkenspreparaat de zoogenaamde tijdwet (stremtijd omgekeerd evenredig aan de enzymconcentratie) niet volgt; bij verdunning van het enzym vond hij namelijk eene veel snellere aangroeiing van den stremtijd, dan op grond dezer wet kon worden verwacht. Bedenkt men nu, dat de vernieling van het enzym door alcali relatief sterker is, naarmate de verdunning grooter is (een reeds lang bekend feit), dan kon niet anders worden verwacht. Hoe lager men echter de temperatuur kiest, waarbij de stremproef uitgevoerd wordt, des te kleiner zal, op grond van het boven medegedeelde, de afwijking van de tijdwet moeten zijn.

	Bij 23° C.	37° C.
Onverdund	3'15"	42"
5 × verdund	16'34"	17"

Bij 23° C. volgt dus het enzym nog tamelijk wel de tijdwet, bij 37° C. vinden we voor de 5 × verdunde oplossing den stremtijd (17 minuten) ongeveer gelijk aan dien bij 23° C. (16 min. 34 sec.) hetgeen weer is toe te schrijven aan de vernieling bij de hoogere temperatuur.

Verder zegt Gewin in zijn stuk, dat door digereeren met HCl de gevoeligheid voor alcali nog toeneemt. Na het boven medegedeelde werd het dus waarschijnlijk, dat bij mijne proef, op bladz. 5 beschreven, slechts schijnbaar eene chymosinarme oplossing was ontstaan door de digestie met zoutzuur; immers de stremtijd van 4 uur 50 minuten werd gevonden bij 37° C. Dat dit wel het geval is geweest, blijkt uit de volgende bepalingen, met een rest van eene vroegere bereiding uitgevoerd:

	Bij 37,5° C.	Bij 30° C.
Niet verwarmd	35"	55"
Verwarmd	6 uren	8'

Slechts *schijnbaar* dus was de stremmende werking opgeheven en het behoeft dus niet te verwonderen, dat uit eene gedigereerde oplossing nog eene hoeveelheid goed coaguleerend werkend enzym

door $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ is neer te slaan. Men kan alleen zeggen, dat de grootere gevoeligheid voor alkali, door de verwarming verkregen, door de reiniging verdwijnt.

Bij herhaling van de proef werd nu de oplossing zoo lang verwarmd, dat de stremtijden bij $25,5^\circ \text{C}$. waren $91''$ voor de niet- en $31'$ voor de wel verwarmde oplossing. Bij $37,5^\circ \text{C}$. werd toen gevonden $33''$ en 6 uren. Volgens Mett 5,2 en 2,3 m.M. Bij het toevoegen van $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ bleek al duidelijk, dat nu veel meer enzym vernietigd was dan bij de eerste proef, zooals trouwens op grond van de langere verhitting en ook van de uitkomsten volgens Mett te verwachten was. Het neerslag bleef n.l. in de oplossing gesuspendeerd; bij het filtreren werd echter een volkomen helder filtraat verkregen, dat de biuretreactie vertoonde en dus albumosen bevatte, die door de vernieling van enzym ontstaan waren. Na het oplossen, dialyseeren en verdunnen werd gevonden:

Oorspronkelijke oplossing $64''$, volgens Mett 4,0 m.M.

Verwarmde en gereinigde oplossing $68''$, volgens Mett 4,3 m.M.

Ook in dit geval bleek van het uiteenloopen der verterende en coaguleerende werking zoo goed als niets meer na de reiniging der gedigereerde vloeistof.

Nu zou men nog kunnen denken, dat de vernieling gedurende de stremproef bij hooge temperatuur voor de verwarmde oplossing *alleen* aan de verdunning (tengevolge van de gedeeltelijke vernieling) toegeschreven zou moeten worden; hoe meer verdund de enzymoplossing is, des te grooter wordt de kans op aantasting door de OH-ionen. Uit de volgende eenvoudige proef blijkt, dat het verwarmen met zoutzuur het ferment gevoeliger maakt voor de hydroxylionen van de melk.

Eene oplossing van gereinigde varkenspepsine werd zoo lang gedigereerd, dat bij 30°C . de stremtijden waren $61''$ en $9'35''$. Bij 23°C . vond ik $2'46''$ en $14'$. De niet verwarmde oplossing werd nu zoo ver verdund, dat de stremtijd bij 23°C . $14'50''$ bedroeg, dus ongeveer gelijk was aan dien voor de verwarmde oplossing gevonden. Bij 30°C . werd toen echter bij deze verdunning gevonden $7'45''$ tegen $9'35''$ voor de verwarmde vloeistof. Hieruit kan dus de gevolgtrekking gemaakt worden, dat de verwarmde oplossing sterker wordt aangetast dan de niet verwarmde bij dezelfde enzymconcentratie, geheel in overeenstemming met de bevindingen van Gewin voor den invloed van de neutralisatie met KOH. Zooals we zagen, verliest het ferment deze grootere gevoeligheid weer door de reiniging.

Na dezen uitslag van de onderzoekingen met gereinigde pepsine is het duidelijk, dat het feit, dat men door digereeren met HCl eene oplossing verkrijgt, die wél verterend, maar niet stremmend werkt, niet langer als argument kan worden aangevoerd voor de dualiteit der fermentwerking, althans niet voor het varkenspreparaat. Op grond van onderzoekingen, waarover later meer, kwam Hammarsten tot de conclusie, dat eigenlijk alleen in *kalfs-*

maagextract typisch chymosine voorkomt. Op grond hiervan, en ook omdat de waarnemingen van verschillende onderzoekers, die met elkaar in strijd zijn, eene eenvoudige verklaring zouden vinden, indien voor het kalfsmaagextract hetzelfde bleek te gelden als voor dat van varkensmagen, heb ik het volgens de methode van Hammarsten bereide kalfsmaagextract in deze richting onderzocht.

	Bij 37° C.	Bij 25,5° C.
Niet verwarmd	75"	166"
Verwarmd	4 uren	99'

Uit deze eenvoudige proef blijkt, dat bij het kalfsenzym zich hetzelfde verschijnsel voordoet, zij het ook minder geprononceerd. Op grond van den tijd van 166" bij 25,5 voor de niet verwarmde oplossing, zou men voor de verwarmde verwacht hebben $\frac{166}{75} \times 4$ uren = 8 $\frac{2}{3}$ uur; na 99 minuten trad echter duidelijk stremming op. Was echter bij 25,5° C. de schadelijke werking der hydroxylionen van de melk geheel opgeheven? Om dit na te gaan liet ik het enzym bij 0° C. inwerken. Daartoe werd in eenige dunwandige reageerbuisjes 10 c.M³. melk gepipetteerd en de buisjes in ijs geplaatst. Na een kwartier werd met 0,5 c.M³. der enzymoplossing vermengd en van tijd tot tijd een buisje in een waterbad van 37° C. overgebracht en dan de tijd bepaald, waarna stolling intrad. Voor de niet verwarmde oplossing werd de proef gelijktijdig uitgevoerd, echter na verdunning met HCl 0,2 % 1:10, om den stremtijd bij 37° C. zoo lang te maken, dat de tijd, noodig voor het opvoeren van de temperatuur van 0° tot 37° C. ten opzichte daarvan slechts kort was. Deze methode is natuurlijk minder nauwkeurig dan de directe bepaling; zooals men ziet zijn de verschillen echter zoo groot, dat deze uitkomsten zeer goed voor oriëntering dienst kunnen doen.

Het melkenzymmengsel stond bij 0°:	Toen stremming in:
Niet verwarmde oplossing . 40 minuten	11 minuten
71 "	10'10"
140 "	3'27"
185 "	2'18"
235 "	1'6"
310 "	43"
De verwarmde oplossing . 375 "	1'25"

Na 375 minuten was de melk dus zoo omgezet door het verwarmde enzym, dat in 1'25" stolling intrad. Voor de niet verwarmde oplossing in 235' zoo ver, dat in 1'5" stremming teweeggebracht werd ¹⁾. Voor de niet verdunde oplossing zou dus de

¹⁾ Hierbij dient men te bedenken, dat de proef altijd in het nadeel der verwarmde oplossing uitvallen moet. Gedurende de verwarming wordt het enzym van de verwarmde oplossing ontleed, van de niet verwarmde niet.

tijd $\frac{1}{10}$ geweest zijn, d. i. $23\frac{1}{2}$ minuten. Naar deze cijfers beoordeeld zou dus de verhouding voor het coaguleerende enzym in de beide vloeistoffen zijn: $23,5:375 = 1:16$. Bij $37,5^\circ$ C. gemeten is ze: $75:4 \times 60 \times 60 = 1:192$. Volgens Mett werd gevonden 1,5 en 3,3 m.M., dus de verhouding 1:4,8.

Eene tweede proef leverde de verhouding 1:22 voor de stremtijden. Zooals reeds gezegd werd, is de methode niet nauwkeurig, maar men kan er met zekerheid uit besluiten, dat bij het verwarmde kalfsenzym zich hetzelfde verschijnsel voordoet als bij het varkenspreparaat gevonden werd.

De bepaling van den stremtijd bij lichaamstemperatuur van volgens Hammarsten bereide, verwarmde kalfsmaagextracten is geen maat voor de hoeveelheid coaguleerend enzym, dat in het extract voorkomt. Bij het digereeren met zoutzuur wordt het coaguleerende enzym slechts schijnbaar vernietigd.

Hoe overtuigend mij de proeven van Hammarsten aanvankelijk ook toeschenen, onder deze omstandigheden kan ik er niet meer de bewijzende kracht aan toekennen voor de dualiteit der enzymwerkingen. Intusschen bestaat er nog een groot verschil tusschen de verhouding 1:4,8 volgens Mett en 1:ongeveer 20 voor de stremtijden. Daarbij moet echter opgemerkt worden, dat het niet onmogelijk, ja zelfs waarschijnlijk is, dat gedurende den langen tijd, dien de oplossingen bij 0° C. moeten staan, het enzym niet volkomen intact is gebleven. Verdere onderzoekingen zullen moeten leeren, in hoeverre het mogelijk is volkomen paralleliteit voor stremming en vertering te bereiken.

Ik ga nu over tot het bespreken van de onderzoekingen van de in den aanvang van dit opstel genoemde schrijvers in verband met de gegevens van mijn eigen onderzoek. In de eerste plaats moet dan worden besproken het werk van Hammarsten, waarvan de resultaten in de reeds genoemde verhandeling zijn medegedeeld. Behalve de talrijke proeven met kalfsmaagextracten, waarbij een der werkingen, hetzij de coaguleerende, hetzij de verterende werd opgeheven en waarover in de voorgaande bladzijden reeds voldoende gesproken werd, bevat ze nog eene reeks van waarnemingen, gedaan aan extracten van de magen van andere dieren, n.l. van het paard, de kip en den snoek. Geen enkel van deze extracten vertoonde dezelfde eigenschappen als dat van kalfsmagen. Wel neemt men bij alle naast de verterende werking de coaguleerende waar, maar overal ziet men bij verdunning de coaguleerende werking veel sneller afnemen dan de verterende. Om een denkbeeld te geven van de snelle toename van den stremtijd haal ik de volgende tabellen van Hammarsten aan, waarin men de werking van kalfsmaagextract vergeleken vindt met dat van andere diermagen, terwijl bovendien de verterende werking volgens Mett is aangeduid.

Verh. der kwadr. volgens Mett.	Kalf. 16,8	Paard. 27,46	Kalf. 10,56	Kip. 4,4	Kalf. 1	Snoek. 1	Verdunning.
Stremtijd . . .	20"	5'	40"	2 uur 25'	10" à 15"	3'	1/8
" . . .	35"	13'	2'	6 uren.	22" à 25"	61/2'	1/6
" . . .	1'	43'	4'		50"	18'	1/32
" . . .	2'	7 uren.	5'		1' 30"	42'	1/24

Deze uitkomsten moesten Hammarsten wel voeren tot hetgeen hij op pag. 52 van zijne verhandeling schrijft: „Wie man dies mit der Annahme, dass die Milchgerinnung nichts anderes als eine Pepsinwirkung ist, vereinbaren soll, kann ich wenigstens augenblicklich nicht sehen.”

En het zijn ook deze uitkomsten, die Hammarsten alleen in het kalfsmaagextract het voorkomen van typisch chymosine doen veronderstellen.

Nu echter meen ik deze verschijnselen eenvoudig zoo te moeten verklaren, dat hier hetzelfde plaats vindt als ik boven voor de varkenspepsine vond. Gedurende de inwerking van het enzym op de melk wordt het door de hydroxylionen gedeeltelijk vernield en wel sterker naarmate het meer verdund is. Vooral bij de proeven (hier niet in extenso medegedeeld) met het extract van snoekmagen komt dit laatste duidelijk uit en Hammarsten zelf wees er reeds op, dat bij hooge enzymconcentratie de stremming nog tamelijk wel volgens de tijdwet plaats vindt, maar bij de meer verdunde oplossingen niet. Of mijne opvatting in deze juist is kan alleen worden uitgemaakt door een experimenteel onderzoek met de enzymen, van deze dieren afkomstig, waaraan dan het hondensaagsap, door schijnvoeding verkregen, zou kunnen worden toegevoegd, want hetgeen Pawlow daarover mededeelt, wijst erop, dat ook daarbij het bedoelde verschijnsel zich voordoet. Het schijnt dus, dat het extract van kalfsmagen in dit opzicht afwijkt, dat het veel bestendiger is tegen alkali door de aanwezigheid van beschuttende stoffen, waardoor het voor de kaasbereiding voor heeft boven het extract van andere dieren voor zoover dat in deze richting onderzocht is.

Een deel van de verhandeling van Hammarsten is gewijd aan de bespreking van het onderzoek van Gewin. Deze laatste onderzoeker heeft o. a. eene poging gedaan, om aan te toonen, dat men bij de verwarming van gereinigd kalfs- en varkensmaagenzym met HCl 0,2 % de verterende en stremmende werking in gelijke mate ziet afnemen, hetgeen natuurlijk een krachtig argument voor de identiteit zou zijn. En werkelijk neemt men bij zijne proeven geruimen tijd een parallel gaan der beide werkingen waar. Wanneer echter door de gedeeltelijke vernieling, het enzym in de oplossing minder geconcentreerd is, gaan ook bij hem de beide werkingen sterk uiteen, evengoed als dat bij Hammarsten het geval was, die van den aanvang af met minder geconcentreerde oplossingen werkte. Na-

tuurlijk heeft Gewin dit uiteenloopen wel opgemerkt, maar hij schrijft: „man sei hier an der Grenze angekommen, wo die Enzym-lösung zu schwach wird, um im Verhältnis 2:8 (zijn gewone werkwijze) mit genügender Genauigkeit Milch zur Gerinnung zu bringen, zur Vergleichung dieses Ergebnisses mit demjenigen der Digestionsprobe. Zur gleichen Zeit fangen die beiden Proben (duplobepaling) an, verschiedene Zeitdauer aufzuweisen.”¹⁾

Hammarsten, die natuurlijk in hetgeen Gewin vond bij de gereinigde producten als ze maar even sterk verdund waren als zijn extracten, eene bevestiging van zijne eigen bevindingen zag, merkt naar aanleiding van het niet meer nauwkeurig kunnen bepalen van den stremtijd op, dat men tijden van 1—4 minuten, waarover het hier liep, nauwkeuriger kan bepalen dan die van 10—40 seconden, die gevonden werden door Gewin, zoolang de oplossing nog weinig was achteruitgegaan door de verwarming met HCl. Ik sluit me geheel aan bij Hammarstens meening in deze en ik kan er nog aan toevoegen, dat ik door nog niet gepubliceerde onderzoekingen, waarbij de gemiddelde fout bij de bepaling van den stremtijd werd bepaald als functie van den stremtijd, vond, dat een tijd van ongeveer 3 minuten de meest gunstige is. Ik geloof, dat de kwestie deze is, dat bij het digereeren na zekeren tijd de werking van de OH-ionen van de melk merkbaar begint te worden en dit zou ook eene verklaring zijn voor hetgeen Gewin waarnam betreffende het onderling niet meer overeenstemmen van twee proeven, want er komt dan een zeer onzeker moment mee in het spel. Dat Gewin bij zijn onderzoekingen den invloed van de melk niet heeft opgemerkt, schrijf ik daaraan toe, dat hij over het algemeen met geconcentreerde enzymoplossingen heeft gewerkt.

Hammarsten maakt ook verder nog interessante bemerkingen over Gewins resultaten, die gedeeltelijk met elkaar in tegenspraak zijn. Zoo neem ik uit Hammarstens verhandeling over een uittreksel uit een tabel van Gewin, waaraan door den eersten de laatste horizontale kolom is toegevoegd, waarin opgegeven is, de achteruitgang van het enzym, gemeten naar de coagulatiesnelheid bij twee verdunningen en naar de vertering volgens Mett.

	9.	10.	11.
Datum.	Zure enzymoplossing (0,2 0/0 HCl).		
	1 c.M. ³ + 1 c.M. ³ water. T.	0,2 c.M. ³ + 1,8 c.M. ³ water. T.	4 ¹ / ₂ c.M. ³ + 5 ¹ / ₂ c.M. ³ HCl 0,2 0/0 Proteolyse.
1 Mei .	5	1 40	32,48
6 Mei .	10	34—37	6,76
Afname.	1/2	1/31	1/68

1) Cursiveering van mij.

Naar aanleiding hiervan schrijft Hammarsten:

„Ein Blick auf den obigen Auszug aus der Tabelle II zeigt, dasz der Unterschied zwischen den Lösungen (Stab 9 und 10) nur in einer ungleich starken Verdünnung mit Wasser besteht. Man sieht also, dasz ein und dieselbe Lösung, wenn sie reicher an Enzym und Säure ist, eine bedeutend geringere Abnahme der Chymosinwirkung anzeigt, als wenn sie ärmer an Enzym und Säure ist, und demselben Verhalten begegnet man auch in der Tabelle III.”

Op grond van mijne uitkomsten kon men hier voor kolom 9 en 10 niet dezelfde verhouding verwachten. Bij de grootere verdunning van het enzym en het zuur in kolom 10 werd klaarblijkelijk op 6 Mei het enzym gedurende de stremproef al sterk aangetast waardoor de schijnbare afname tot $\frac{1}{21}$ van de sterkte verklaard wordt; in het meer zure medium heeft bij de hoogere concentratie het ferment betrekkelijk veel minder te lijden gedurende het stremmen.

Waarom volgens de stremproef de verhouding $\frac{1}{3}$, volgens Mott slechts $\frac{1}{4,8}$ gevonden werd door Gewin is me niet duidelijk; ik houd het echter voor waarschijnlijk, dat bij zoo korte stremtijden (5 en 10 sec.) groote procentische fouten gemaakt worden, zoodat aan deze verhouding $\frac{1}{3}$ geene groote waarde te hechten is. Hammarsten haalt nog meer tegenstrijdigheden in Gewins uitkomsten aan; ze kunnen echter alle op dezelfde wijze verklaard worden.

Ik kom nu tot Gewins onderzoek, voor zoover dat nog niet is besproken naar aanleiding van Hammarstens kritiek er op. Een gedeelte van zijn werk was er op gericht, na te gaan, in hoeverre Bang gerechtigd was tot het aannemen van een nieuw ferment, de *parachymosine* naast de chymosine. Bang had voor deze twee enzymen vier verschilpunten gevonden, n.l.: 1°. het verschillend gedrag bij verdunning; de stremtijd neemt voor parachymosine veel sneller toe; 2°. toevoeging van CaCl_2 heeft meer invloed op de werking der parachymosine; 3°. de beide enzymen gedragen zich verschillend tegen verhitten; 4°. ze gedragen zich verschillend tegenover alkali.

Wat punt 1 betreft, op blz. 7 wees ik er reeds op, dat Gewin voor de varkenspepsine (Bangs parachymosine) ook het niet volgen der tijdwet vond; hij meent echter de oorzaak daarvan niet te moeten zoeken in het bestaan van een ander enzym, maar in het feit, dat de varkenspepsine veel gevoeliger is voor alkali (door afwezigheid van de verontreinigingen, die bij kalfsmaag-extract beschuttend werken) waardoor bij het neutraliseeren van de enzymoplossing voor de stremproef het varkenspreparaat meer wordt aangetast dan dat van het kalf. Werd n.l. met CaCO_3 geneutraliseerd in plaats van met NaOH , dan volgde de varkenspepsine tot 32-voudige verdunning nog de tijdwet, terwijl in het eerste geval bij 4-voudige verdunning zich reeds afwij-

kingen vertoonden. Werd daarentegen *niet* geneutraliseerd, dan werd bij 128-voudige verdunning nog een normale, met de tijdwet overeenkomende stremtijd gevonden. Hoewel nu toegegeven moet worden, dat door het neutraliseeren van de oplossing de varkenspepsine sterker wordt aangetast dan het kalfsenzym, geloof ik niet, dat hierin de eenige of zelfs de hoofdoorzaak gelegen is en wel om een reden, die later blijken zal. Veel waarschijnlijker acht ik het, dat bij de geneutraliseerde oplossingen de invloed der melk zich al zeer spoedig doet gevoelen; bij neutralisatie met CaCO_3 , waarbij dus CaCl_2 ontstaat, wordt, zooals ik vroeger aantoonde, het mengsel met melk rijker aan waterstofionen en daardoor is de kans kleiner op aantasting van het enzym, want met de vermeerdering der H^+ -ionen gaat vermindering der OH^- -ionen gepaard, en deze vermindering is nog sterker als in 't geheel niet geneutraliseerd werd. Zoo meen ik het langer volgen van de tijdwet te moeten verklaren voor de CaCl_2 oplossingen en nog sterker van de zure oplossing. Het verschil in gedrag bij verdunning kan dus geene reden meer zijn, om in de varkenspepsine een bijzonder enzym aan te nemen, zooals Bang deed.

Van de verschillen onder 3 en 4 genoemd, heeft Gewin afdoende aangetoond, dat ze verdwijnen met de verwijdering van de verontreinigingen uit het kalfsmaagextract. Zooals in den aanvang reeds werd gezegd, voor een onderscheiding van parachymosine naast chymosine bestaat volstrekt geen grond meer, nu de vermeende verschilpunten op alleszins aannemelijke wijze zijn verklaard.

Thans volgen de onderzoekingen van Schmidt-Nielsen, die, zooals we reeds zagen, zijn proeven zoo inrichtte, dat het verschil in beide enzymwerkingen zoo sterk aan het licht kwam, dat ze wel zeer overtuigend werken moesten voor de dualistische opvatting. Op blz. 3 heb ik reeds een van zijn uitkomsten aangehaald en de wijze waarop S.-N. meent ze te moeten verklaren. Hij meent n.l. dat bij het digereeren met HCl in hoofdzaak de chymosine wordt vernield, de pepsine slechts weinig. In neutrale oplossing, zegt hij dan, werkt de pepsine niet, in de zure oplossing wel en deze pepsinewerking zou dan ook coagulatie tengevolge hebben. In de verdunde, niet gedigereerde oplossing is de pepsine ook zoo sterk verdund, dat men geen zooveel snellere werking in de aangezuurde melk verwachten kan. De kleinere pepsineconcentratie in de verdunde oplossing werd door hem nog aangetoond door de zeer langzame vertering van een vlokje fibrine. Daar S.-N. zijne enzymoplossingen voor de stremproef neutraliseerde, geeft Gewin woordelijk de volgende verklaring van diens uitkomsten: „in der digerierten Lösung wird das Enzym durch Neutralisieren abgeschwächt, durch darauffolgendes Ansäuern wird aber ein Teil behalten, der imstande ist, eine Fibrinflocke in ziemlich kurzer Zeit zu lösen, während in der nicht digerierten Lösung das Enzym durch Neutralisieren

weniger geschädigt wird und labende und proteolytische Wirkung durch Verdünnen in gleichem Maße abnehmen."

Dezelfde verklaring dus, die hij van Hammarstens uitkomsten gaf. Deze laatste heeft er in zijn kritiek op Gewin reeds op gewezen, dat bij het vermijden van de neutralisatie en eenvoudig verdunnen met water precies hetzelfde gevonden wordt, zoodat de verklaring van Gewin niet juist kan zijn. Daar hij voor de werkwijze van Schmidt-Nielsen geen cijfers opgeeft, heb ik diens proeven herhaald, daarbij echter zoowel de neutralisatie als de verdunning met water achterwege latend, 1 c.M³. van de zure (0,2 % HCl) enzymoplossing werd vermengd met 25 c.M³. melk. In het volgende tabelletje is oplossing A de verwarmde, oplossing B de niet verwarmde, maar de met HCl 0,2 % verdunde vloeistof. Bij de „zure stremming" bevatte het melkenzymmengsel in het geheel 0,64 % HCl.

	Oplossing A.	Oplossing B.
1. Neutrale stremming ¹⁾	315'	310'
Zure " 	2' 43"	35'
2. Neutrale stremming	250'	240'
Zure " 	3' 22"	50'

Bij No. 2 was in het geheel 0,5 % HCl toegevoegd voor de „zure stremming".

Hoc het geheele beeld veranderd wordt, door bij 26° C. te werken in plaats van bij 37° C., volgt uit de volgende bepalingen. (Dezelfde melk als bij 2, eveneens met 0,5 % HCl aangezuurd).

	Oplossing A.	Oplossing B.
Neutrale stremming	105'	330'
Zure " 	11' 45"	91'

Bij deze proeven werd dus niet geneutraliseerd en toch is het resultaat tamelijk wel gelijk aan dat van Schmidt-Nielsen, waaruit ik het besluit trek, dat niet de neutralisatie van de enzymoplossing voor de vermenging met melk de oorzaak van het verschijnsel kan zijn. De verklaring ligt nu echter voor de hand. Bij de neutrale stremming wordt gedurende de proef het enzym grootendeels vernield door de OH-ionen van de melk, die bij het toevoegen van het HCl zoo sterk verminderd worden, dat bij de zure stremming weinig sprake meer kan zijn van vernieling, vandaar de korte stremtijd. Voor de verdunde, niet verwarmde oplossing nemen we die werking der OH-ionen niet, of althans in enorm veel mindere mate waar, zoodat daar de stremtijden zich ongeveer als de H-ionenconcentraties zullen verhouden.

(1) Wel is waar werd hier dus iets zuur toegevoegd, maar de invloed daarvan is zeer gering. Zie noot pag. 6.

Dus ook de aanvankelijk zoo overtuigende uitkomsten van dezen onderzoeker hebben hierdoor hare bewijzende kracht voor de dualiteit verloren en daarmee wordt een van de krachtigste argumenten der dualisten te niet gedaan.

Tenslotte moeten de onderzoekingen van Sawitsch ¹⁾ nog vermeld worden, die door mijne resultaten van grooter belang geworden zijn. Hij experimenteerde met maagsap van een hond met maagfistel en doorgesneden slokdarm volgens Pawlow, en vergeleek verschillende porties, op verschillende tijden verkregen en vond daarbij steeds parallellisme voor vertering en stremming. Niettegenstaande zulk maagsap, volgens de uitkomsten van Pawlow, blijkbaar ook door de OH-ionen der melk wordt aangetast, moest hier toch wel paralleliteit gevonden worden tengevolge van zijn werkwijze. Sawitsch werkte n.l. met oplossingen, waarvan hij de enzymconcentratie, naar de stremming beoordeeld, gelijk maakte en vond dan ook voor de vertering gelijke cijfers. Nu is het duidelijk, dat bij de gelijke enzymconcentratie de mate van vernieling door de melk ook dezelfde moest zijn en nu wordt het begrijpelijk, dat bij eene zoodanige inrichting van de proef de vermelde uitkomst moest worden verkregen. Vervolgens heeft hij ook de digestie met HCl uitgevoerd, maar vindt dan niet het gewone uiteenloopen der beide werkingen.

Niet onwaarschijnlijk lijkt het me, dat dit zoo te verklaren is, dat door het optredende CO₂ bij de neutralisatie met NaHCO₃, die hij toepaste, de OH-ionen der melk nog in zoo sterke mate werden verminderd, dat ze slechts weinig schade meer aan het enzym konden toebrengen. Vooral als men bedenkt, dat Sawitsch 1 c.M³. van de geneutraliseerde oplossing met slechts 5 c.M³. melk vermengde voor zijn stremproef. Door een nader onderzoek zou moeten blijken of deze verklaring juist is. Bij de bespreking van de uitkomsten van Schmidt-Nielsen meent Sawitsch die op dezelfde wijze als Gewin te moeten verklaren en hij vermeldt voor dit doel een paar proeven, waaruit zou moeten blijken, dat het uiteenloopen der beide werkingen, zeer goed aan de neutralisatie met NaOH kan worden toegeschreven. Ik moet bekennen, dat deze proeven niet zeer overtuigend op me hebben gewerkt, want de gevonden verschillen zijn zeer klein in vergelijking met die door Schmidt-Nielsen gevonden. Zooals we trouwens reeds zagen is deze verklaring dan ook niet steekhoudend, want bij het achterwege laten der neutralisatie vindt men hetzelfde. Wel interessant is intusschen, dat Sawitsch het uiteenloopen der beide werkingen tengevolge van de neutralisatie met NaOH en NaHCO₃ kan opheffen door toevoeging van groote hoeveelheden CaCl₂. Daardoor wordt immers de H-ionenconcentratie belangrijk verhoogd en het zou van belang zijn, om eens te onderzoeken, of ook hier de invloed

¹⁾ l. c.

van de OH-ionen der melk, waar tot nu toe geen rekening mee gehouden is, niet een rol speelt. Het feit, dat het met NaOH geneutraliseerde maagsap, zonder toevoeging van CaCl_2 , sterke afwijkingen van de tijdwet vertoont (tabel VII van Sawitsch' verhandeling) duidt daar sterk op; zoo ook tabel VI.

Wanneer ik nu de uitkomsten van de verschillende onderzoekers, die zich met de kwestie hebben beziggehouden, samenvat, dan zie ik geen reden meer, om een onderscheid te maken tusschen een verterend en een stremmend werkend enzym, eene opvatting, waartoe de zorgvuldige onderzoekingen van Hammarsten, destijds wel moesten leiden. En waar we nu verder aantoonde, dat er noch voor het aannemen van een bijzonder enzym, dat specifiek kaasstof verteert, noch van een enzym parachymosine, eenige grond bestaat, is de slotsom deze:

In het stremsel komt, voor zoover thans bekend, slechts één enkel enzym voor, waaraan we wel het beste den naam pepsine geven. Wanneer we nu eens de coaguleerende, dan weer de verterende werking op den voorgrond zien treden, dan is dit een gevolg van de verontreinigingen, waardoor het ferment in zijn normale werking gestoord wordt.

Zoo beschouwd is het ook niet vreemd meer, dat we dikwijls eene stremmende werking waarnemen, ook daar waar van het in aanraking komen met melk geen sprake is, zooals bij kippenmagen, visschen enz., en nu is ook de werking van het stremsel bij de kaasrijping niet meer aan de chymosine toe te schrijven, maar als eene volkomen begrijpelijke vertering door pepsine te beschouwen. Zooals ik in mijn vorige verhandeling reeds zeide voor de chymosine, van het oogenblik af, waarop het stremsel aan de melk is toegevoegd, begint de pepsine hare verterende werking, waarvan de stremming het eerste zichtbare verschijnsel is. De weiproteïne van Hammarsten is dus dan te beschouwen als een verteringsproduct. Bij het verder verwerken van de wrongel zet de pepsine hare werking voort, nog versterkt door de vermeerdering der H-ionen door de optredende melkzuurgisting, zooals dat vroeger is beschreven.

Wanneer ik me nu tenslotte afvraag, in welke richting het verder onderzoek van dit ingewikkelde vraagstuk moet worden gestuurd om de meeste kans op succes te hebben, dan geloof ik, dat in de eerste plaats noodig is, de quantitative en kwalitatieve studie van den invloed van de omstandigheden (aard en hoeveelheid der verontreinigingen, alkaliteit, temperatuur enz.), op dit gevoelige enzym; onderzoekingen dus in den geest, zooals ze door Gewin zijn ondernomen. Ik ben het namelijk niet met Hammarsten eens, dat het beter zou zijn, met kalfsmaagextract te werken in plaats van met enzymoplossingen, volgens Pehling bereid. Vergelijkt men het gehalte aan droge stof daarvan bij hetzelfde stremmend vermogen met de cijfers die Hammar-

sten daarvoor opgeeft, dan valt het groote verschil direct in het oog. Zoolang de kwestie tot op zekere hoogte een meer practischen achtergrond had, n.l. het leeren kennen van de werking van het maagsap als zoodanig, was de werkwijze van Hammarsten natuurlijk volkomen gerechtvaardigd, voor een zuiver wetenschappelijk doel doet men, geloof ik, beter, te beginnen met zoo zuiver mogelijke enzymoplossingen.

Ueber die Enzymen des Labes. (Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Es wurde eine kurze Uebersicht gegeben von den Arbeiten über die Enzyme im Magensaft. Es wurde darauf hingewiesen, dasz man bisher glaubte in Extracten von Kalbsmägen vier verschiedene Enzyme anzunehmen berechtigt zu sein, n.l. Pepsin, Chymosin, Parachymosin und ein viertes von Petry gefundenes. Für die beiden letzten Enzyme wurde vor kurzem gezeigt, dasz es kein Grund gibt sie als besondere Fermente zu betrachten. Die folgenden Beobachtungen führten zum Schluss, dasz es auch kein Grund mehr gibt zwischen einem labenden und verdauenden Enzym zu unterscheiden.

1. Durch Reinigen der erhitzten, nicht labenden Schweinspepsinlösung (Dialyse und Fällung mit $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ wurde eine Enzymlösung erhalten, die mit der nicht erwärmten Lösung vollkommen identisch war; das coagulierende Enzym war also nur *scheinbar* vernichtet bei der Digestion.

2. Das gereinigte Schweinspepsin wird während des Gerinnungsversuchs durch die Hydroxytionen der Milch stark geschädigt. Mit HCl 0,2 % digeriertes Enzym ist noch bedeutend empfindlicher in dieser Hinsicht. Sobald die Temperatur höher ist, wird es mehr geschädigt. So wurde z. B. gefunden:

	Bei 37,5° C.	Bei 30° C.
Nicht erw.	35"	55"
Erw.	6 Stunden	8'

Für das Schweinsenzym ist also die Gerinnungszeit bei Bruttemperatur kein zuverlässiges Masz für das coagulierende Ferment.

3. Für nach Hammarsten bereitete Kalbsmageninfusion wurde dasselbe gefunden. Nach den Gerinnungsversuchen bei 37° C. wurde für die nicht erwärmte und die digerierte Lösung das Verhältnis des Enzyms zu 1:192, bei 0° C. zu 1:± 20 gefunden. Nach Mett fand ich dann 1:4,8. Die langen Gerinnungszeiten der erwärmten Kalbsmageninfusionen sind der Zersetzung des Enzyms durch die Hydroxytionen der Milch zuzuschreiben.

4. So wird der bekannte Versuch Schmidt-Nielsen's auch ganz einfach dadurch erklärt, dasz die erwärmten Lösun-

gen bei „neutraler Coagulation“ stark zerstört werden, bei „saurer Coagulation“ dagegen nicht infolge der bedeutenden Verminderung der OH-Ionen in der Milch. Es wurde weiter gezeigt, dass die Erscheinung nicht auf Schädigung durch die Neutralisation zurückgeführt werden kann, denn auch ohne Neutralisation findet man ein starkes Auseinandergehen der beiden Wirkungen.

Stellt man alle die von den verschiedenen Forschern erhaltenen Resultate zusammen, so sehe ich kein Grund mehr, im Labe mehr als ein einziges Enzym, das Pepsin, anzunehmen. Nur den äusseren Umständen zufolge tritt bald die eine, bald die andere Wirkung in den Vordergrund.
