

# RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE HOORN.

## Over de bepaling der stremkracht van handelsstremsel.

DOOR

Dr. W. VAN DAM.

Het stremsel, dat tegenwoordig voor de kaasbereiding gebruikt wordt, is in verreweg de meeste gevallen een fabriekmatig bereid product en een veel gebruikt handelsartikel, waarvan een steeds toenemend aantal monsters aan de contrôleafdeelingen der Rijkslandbouwproefstations wordt toegezonden, om op stremkracht onderzocht te worden. De omstandigheid, dat bij dit onderzoek aan het proefstation Hoorn herhaaldelijk moeilijkheden werden ondervonden, die klaarblijkelijk hun grond vinden in gebreken, die de gebruikte methode aankleven, is de aanleiding geweest tot het verrichten van het onderzoek, waarvan de uitkomsten in de volgende bladzijden worden medegedeeld.

Een zeer uitvoerig onderzoek over de stremkrachtbepaling werd verricht door DEVARDA <sup>1)</sup>; dit heeft geleid tot de invoering van een methode, die ook nu nog de algemeen gebruikelijke is. Ze komt hierop neer: Men bepaalt den tijd, waarin een bepaalde hoeveelheid melk door een bepaalde hoeveelheid stremsel, onder gemakkelijk te reproduceeren omstandigheden, tot coagulatie gebracht wordt. De proef wordt herhaald met een standaardstremsel, waarvan de sterkte bepaald is door een twaalfstal monsters normale, versche melk op dezelfde wijze te doen stremmen, waarna het gemiddelde van de 12 genoteerde tijden wordt genomen ter bepaling der stremkracht. Zooals bekend is, drukt men deze uit in het aantal deelen melk, dat bij 35° C door 1 deel stremsel wordt gestremd in den tijd van 40 minuten. De sterkten der beide enzijmen verhouden zich omgekeerd als de stremtijden.

Bij de overweging, in hoeverre door deze werkwijze bruikbare resultaten te verkrijgen zijn, dringen zich verschillende vragen op, die slechts ten deele zijn beantwoord door DEVARDA. In de eerste plaats deze: hoe groot is de fout, die bij het bepalen van den stremtijd gemaakt wordt? Dan: is de verhouding der stremtijden voor twee enzijmen onafhankelijk van het monster melk dat voor de proef gebruikt wordt? En verder: loopen de stremtijden, die bij

<sup>1)</sup> Die landw. Versuchsstationen. Bd. 47 (1896) bldz. 401.

2005763

het vaststellen van de sterkte van het standaardstremsel door middel van een 12-tal melkmonsters verkregen worden, niet zóóveel uiteen, dat in het genomen gemiddelde nog een groote fout schuilen kan? En heeft het jaargetijde, waarin de waarde van het standaardstremsel wordt vastgesteld geen invloed op de uitkomst?

Ter beantwoording van de eerste vraag, betreffende de grootte der fout, die bij het bepalen van den stremtijd wordt gemaakt onder de omstandigheden, waaronder volgens de voor de proefstations vastgestelde methode moet gewerkt worden, verzocht ik den heeren LAGERS en VÜRTHEIM, assistenten aan de contróleafdeeling van dit proefstation, een serie stremmingen te verrichten met één en hetzelfde monster melk. Om zooveel mogelijk persoonlijke invloeden uit te sluiten, werd de chronometer in- en buiten werk gezet door een helper. Uit de zoo verkregen cijfers berekende ik dan, met behulp van de formule:

$$F = \frac{\sqrt{\sum f^2}}{\sqrt{n(n-1)}}$$

de middelbare fout van het gemiddelde. Hierin stelt  $f$  voor, het verschil van iedere waarneming met het rekenkundig gemiddelde van alle bepalingen en  $n$  het aantal metingen. Zoo werd gevonden:

Tabel I.

I.	II.
Stremtijden in sec.	Stremtijden in sec.
342	513
335	524
331	529
338	523
337	520
329	526
330	524
336	525
Gem. 335	Gem. 523
$F = 1,6 \text{ sec.} = 0,47 \text{ pct.}$	$F = 1,7 \text{ sec.} = 0,33 \text{ pct.}$

Uit deze uitkomst blijkt dus, dat de middelbare fout, hoewel grooter dan ze voor sommige chemische analyses uitvalt, niet van dien aard is, dat op grond daarvan de methode als onbruikbaar zou moeten worden beschouwd.

Wat het tweede punt betreft, het al of niet onafhankelijk zijn van de verhouding der stremtijden van 2 en zijmoplossingen van den aard

van de gebruikte melk, hierop is voor eenigen tijd de aandacht gevestigd door HÖFT<sup>1)</sup>.

Bij opzettelijk hierop gerichte onderzoeken vond deze onderzoeker cijfers, waarvan ik er hier een paar overneem. Met verschillende monsters *leb*, *A*, *B* en *C* werden de stremtijden bepaald voor melk van verschillende herkomst. De stremtijden van *A* gelijk 100 gesteld verkreeg HÖFT:

Tabel II.

	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
	(secunden)		
Melk <i>a</i> . . . .	100	205	186
„ <i>b</i> . . . .	100	182	170

Bij een volgende proef, die eenige malen herhaald werd met de melk van groote boerderijen, vond hij:

Tabel III.

Proef	Melk <i>a</i> .			Melk <i>b</i> .		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
1 . .	100	147	99	100	163	106
2 . .	100	140	97	100	145	98
3 . .	100	150	88	100	156	94
4 . .	100	152	97	100	158	103
5 . .	100	158	95	100	155	103
6 . .	100	159	96	100	150	101
7 . .	100	147	90	100	168	111

Naar aanleiding van deze cijfers merkt HÖFT op, dat het mogelijk is, dat de afwijkingen gedeeltelijk op rekening te stellen zijn van onvermijdelijke waarnemingsfouten, maar waar de grootte dezer fouten door hem niet werd bepaald, tast men hier eenigszins in het duister.

Ik voeg hier nog aan toe een serie bepalingen met 2 monsters stremselpoeder, éénmaal per maand uitgevoerd, gedurende een jaar, door de heeren LAGERS en VÜRTHEIM. De stremtijden van *B* werden omgerekend op het gehalte van *A* door middel van den factor, die uit de beide eerste waarnemingen werd afgeleid. De cijfers zijn gemiddelden van de door beide waarnemers gevonden waarden, die slechts zeer weinig uiteenliepen.

<sup>1)</sup> Milchw. Zentralbl. Bd VI (1910) bldz. 49.

Tabel IV.

Datum	A stremtijd in sec.	B stremtijd in sec.
1910.		
11 October . . . . .	559	559
8 November . . . . .	498	502
13 December . . . . .	442	447
1911.		
10 Januari . . . . .	447	447
7 Februari . . . . .	387	397
7 Maart . . . . .	342	357
11 April . . . . .	390	394
9 Mei . . . . .	456	471
13 Juni . . . . .	513	517
11 Juli . . . . .	517	553
17 Augustus . . . . .	487	510
12 September . . . . .	501	531
10 October . . . . .	537	537

Uit deze cijfers volgt dus duidelijk, dat de verhouding der stremtijden voor deze beide enzymen geenszins constant is. De afwijkingen voor de maanden Febr., Maart, Mei, Juli, Aug. en Sept. zijn grooter dan de verschillen, die men op rekening van onvermijdelijke fouten moet stellen, zooals uit de cijfers van tabel I blijkt.

HÖRT merkt dus zeer terecht op, dat dit verschijnsel een reden is, om bij de stremkrachtbepaling een zekere speling toe te laten, waarvan de grootte door meer uitvoerige onderzoekingen moet worden bepaald. Intusschen dient hier opgemerkt te worden, dat de uit dit verschijnsel voortspruitende onzekerheid belangrijk kleiner wordt, indien men bij het onderzoek twee verschillende melkmonsters gebruikt, zooals aan dit proefstation altijd geschiedt. Het onderzoek met nog een derde monster zou de waarschijnlijkheid voor het vinden van het juiste cijfer wel zeer groot maken. Ik kom later op de mogelijke oorzaak van hetgeen door HÖRT en aan dit proefstation werd waargenomen, in een ander verband, nog terug.

Nu volgen nog de beide laatste bovengestelde vragen, of n.l. in de waarde, die voor het normaalstremsel gevonden wordt door het uitvoeren der stremproef met een 12-tal verschillende melkmonsters, niet nog een te groote fout schuilt en of deze waarde ook niet van het jaargetijde afhangt. Het is n.l. een bekend feit, dat het stremvermogen van de melk zóó zeer uiteenloopt, dat in het gemiddelde van een 12-tal metingen nog wel een groote fout kan schuilen. En bovendien varieert het vermogen om met leb te coaguleeren sterk voor de verschillende jaargetijden. DEVARDA heeft dan ook in zijn aangehaalde verhandelingen in het bijzonder de aandacht gevestigd

op de eigenschappen, die de melk moet hebben om ze als „normaal-melk” te kunnen gebruiken bij het vaststellen van den „titer” van het standaardstremsel.

Om een idee te geven van de grootte der fout, die onder verschillende omstandigheden de waarde, die men voor het normaalstremsel vindt, nog aankleeft, heb ik de moeite genomen, uit enkele reeksen van cijfers uit de mededeeling van DEVARDA en van de contrôle-afdeeling van het proefstation Hoorn, de middelbare fout van het gemiddelde te berekenen.

Tabel V.

1. Bepaling der sterkte in 1890 (DEVARDA) 2 in 1891. (DEVARDA).			
Maand	Sterkte 1 op	Maand	Sterkte 1 op
22 Februari . . .	145 400	Maart . . .	151 000
20 April. . . . .	156 000	Maart . . .	150 000
24 April. . . . .	145 700	Mei . . . . .	145 400
26 Mei . . . . .	159 500	Juni . . . . .	164 100
28 Mei . . . . .	160 000	Juni . . . . .	156 000
Augustus . . . . .	159 500		
	<hr/>		<hr/>
Gem . . . . .	153 800	Gem. . . . .	153 400
F = ± 2 850 of 1,8 pct.		F = ± 3 180 of 2,1 pct.	

We zien dus, dat bij een onderzoek, dat zich over een half jaar uitstreckte de middelbare fout reeds 1,8 pct. van de waarde bedraagt; in 1891 was de fout 2,1 pct. Deze bepalingen waren uitgevoerd met wat DEVARDA „normale” melk noemt. Hoewel de schrijver het er niet bij zegt, schijnt toch uit hetgeen in zijn geschrift volgt, te kunnen worden aangenomen, dat het melk van dezelfde herkomst was, waaraan deze metingen zijn verricht.

3. Bepaling der sterkte van een stremselpoeder door stremming van 10 monsters melk, afkomstig van groote boerderijen of kaas-fabrieken, in Juni 1910 (Proefstation Hoorn).

Tabel VI.

1 . . . . .	1 : 113 600
2 . . . . .	1 : 109 700
3 . . . . .	1 : 111 000
4 . . . . .	1 : 111 300
5 . . . . .	1 : 92 500
6 . . . . .	1 : 92 300
7 . . . . .	1 : 93 900
8 . . . . .	1 : 94 800
9 . . . . .	1 : 92 100
10 . . . . .	1 : 91 900
	<hr/>
Gem. 1 :	101 310
F = ± 3060 of ± 3,0 pct.	

4. Bepaling van de sterkte van hetzelfde poeder (als van 3), door éénmaal 's maands, gedurende een geheel jaar de stremproef uit te voeren met een monster melk van een kaasfabriek, waarbij steeds verse melk werd onderzocht (Proefstation Hoorn).

Tabel VII.

Maand	Sterkte 1 op:
1910	
11 October . . .	84 581
8 November . . .	94 815
13 December. . .	106 964
1911	
10 Januari . . .	105 789
7 Februari . . .	122 293
7 Maart . . . . .	138 129
11 April . . . . .	121 136
9 Mei . . . . .	103 504
13 Juni . . . . .	92 086
11 Juli . . . . .	91 430
17 Augustus . . .	96 970
12 September . .	94 349
	Gem. 104 337
	F = ± 4529 of ± 4,3 pct.

Verdeelen we dus de bepalingen over een geheel jaar, dan wordt onder den invloed der veranderingen, die een gevolg kunnen zijn van het verschil in jaargetijde, de middelbare fout nog aanmerkelijk grooter.

5. Bepaling van de sterkte van een stremsel met de melk van 4 boerderijen (DEVARDA).

Tabel VIII.

1. . . . .	1 : 173 000
2. . . . .	1 : 168 000
3. . . . .	1 : 157 000
4. . . . .	1 : 163 000

Voor het berekenen der fout is het aantal waarnemingen te klein, maar ook uit deze cijfers blijkt wel, dat een gemiddelde eruit nog een groote fout kan bevatten.

6. Bepaling der sterkte van een stremselpoeder door uitvoering der stremproef met de gemengde melk van steeds dezelfde 24 koeien van één stal (DEVARDA).

Tabel IX.

Maand.	Sterkte 1 op
11 April . . . . .	86 393
14 „ . . . . .	85 470
17 „ . . . . .	86 021
2 Mei . . . . .	87 912
30 „ . . . . .	85 106
31 „ . . . . .	84 033
1 Juni . . . . .	87 336
4 „ . . . . .	82 304
Gem. . . . .	85 572
F = ± 637 of ± 0,74 pct.	

7. Stremtijden, gedurende een jaar met dezelfde melk bepaald, met 2 lebpreparaten (Hörr).

Tabel X.

Maand.	I. Stremtijd in sec.	II. Stremtijd in sec.
8 Januari . . . . .	—	180
30 „ . . . . .	115	158
14 April . . . . .	120	—
25 Mei . . . . .	129	177
14 Augustus . . . . .	147	193
18 „ . . . . .	124	—
27 „ . . . . .	139	242
28 „ . . . . .	142	—
31 „ . . . . .	132	—
11 September. . . . .	157	234
25 „ . . . . .	134	197
6 October . . . . .	—	212
9 „ . . . . .	202	310
16 „ . . . . .	156	235
13 November. . . . .	117	170
11 December. . . . .	128	182
Gem. . . . .	139	Gem. . . . . 207
F = ± 6,0 of ± 4,3 pct.		F = ± 12,2 of ± 5,9 pct.

Aan deze voorbeelden zou ik nog verschillende andere kunnen toevoegen, maar uit de aangegeven cijfers blijkt voldoende; dat in de waarde, die men volgens de aan de proefstations gebruikelijke methode vindt voor het *standaardstremsel* (waarvan dus de sterkten van de handelsstremfels worden afgeleid) fouten kunnen schuilen, die zelfs procenten bedragen, en op grond daarvan moet

de methode als *geheel onvoldoende* worden beschouwd. Dat ze niet-tegenstaande deze ongunstige uitkomsten toch nog goede diensten heeft kunnen bewijzen is het gevolg daarvan, dat een goed stremsel-poeder bij oordeelkundige bewaring zich wel een paar jaren goed schijnt te houden. Heeft men dan eenmaal een zekere waarde aangenomen voor zijn sterkte, dan is men in staat, om gedurende dien tijd de onderlinge verhouding van ingezonden handelsstremfels er mee te bepalen, maar ook hier heeft men geen zekerheid, dat niet langzamerhand foutieve uitkomsten worden medegedeeld, want we hebben nu eenmaal geen middel om kleine veranderingen in de stremkracht te constateeren. Dit gelukt eerst als de verandering procenten gaat bedragen. En zoo staat men dan na verloop van een paar jaren opnieuw voor de moeielijkheid van het vaststellen van de waarde van een versch standaardpoeder. De ervaring aan dit station leerde, dat daarmee plotseling de standaardwaarde zóóveel kon verspringen, dat moeielijkheden met den handel onvermijdelijk waren, en een poging om een middel te vinden, waardoor kleine veranderingen in stremkracht van een stremsel-poeder geconstateerd kunnen worden moest dus als volkomen gerechtvaardigd beschouwd worden. In hoeverre die poging geslaagd is moge uit het volgende blijken.

Het gebruik van melk voor de „titerstelling” van een stremsel is dus uitgesloten op grond van de talrijke verschillen, die zich in de samenstelling van dit vocht voordoen. Het tot weging brengen van het enzym is uitgesloten, omdat het niet in zuiveren toestand te verkrijgen is; maar bovendien loopt het hier over zulke kleine hoeveelheden, dat daaraan niet gedacht kan worden. Er blijven dan twee mogelijkheden over voor het vinden van een maatstaf, nl. het gebruiken van caseïnekalkoplossingen, die ook door leb worden gecoaguleerd, zooals HAMMARSTEN vond, of het gebruik maken van een andere eigenschap van leb, die in bekende verhouding staat tot het stremmend vermogen. De eerst genoemde methode heb ik niet opzettelijk beproefd; vroeger opgedane ervaringen met caseïnekalkoplossingen maakten het waarschijnlijk, dat het ondoenlijk is alle factoren, die op de stremming van invloed zijn, voldoende scherp te reproduceeren. Maar in deze richting werd vooral niet verder gezocht, omdat mijn vroeger <sup>1)</sup> uitgevoerde onderzoekingen over de enzymen van het stremsel de hoop wettigden, dat het toen gevondene als basis zou kunnen dienen voor een methode van stremkrachtbepaling. Door PETRY <sup>2)</sup> en mej. VAN HERWERDEN <sup>3)</sup> werd gelijktijdig gevonden, dat de werking van de leb na de stremming van melk niet

1) Over de enzymen van het stremsel. Deze verslagen n<sup>o</sup>. 8, 1910.

2) HOPMEISTERS Beiträge. Bd. VIII, 356.

3) Zeitschr. für Physiol. Chemie. Bd. 52, 184.



ophoudt. PERRY meende dit te moeten toeschrijven aan een bijzonder enzym, dat in neutrale oplossing eiwit kon verteren. Beiden onderzoekers was het echter in hoofdzaak te doen om den aard van de reactieproducten bij deze werking, zoodat de gevonden eigenschap niet quantitatief werd bestudeerd. Ik heb toen aangetoond <sup>1)</sup>, dat men bij de werking van leb op kaasstof, d.w.z. uitgewasschen wrongel, bij de waterstofionenconcentratie die voor de Edammerkaas normaal is ( $\pm 1 \times 10^{-5}$  n.) een krachtige vertering van de paracaseïne constateert en tevens, dat deze vertering niet veroorzaakt wordt door pepsine of een nieuw enzym, zooals PERRY meende, maar door hetzelfde ferment, dat de stremming van de melk veroorzaakt, de chymosine. Het lag dus nu voor de hand om te beproeven:

- 1°. Of voor verschillende preparaten de stremmsnelheid en de vertering van kaasstof parallel gaan.
- 2°. Indien dit het geval is, de omstandigheden na te gaan, waaronder de vertering moet plaats hebben, om ze te kunnen gebruiken als middel om de activiteit van een stremmsel scherper te kunnen bepalen dan tot nu toe mogelijk was.

De proeven werden als volgt uitgevoerd. In nauwhalzige kolfjes van 100 c.M<sup>3</sup>. inhoud werden gelijke hoeveelheden caseïne (MERCK) gewogen en 100 c.M<sup>3</sup>. vloeistof van ongeveer bekende H-ionenconcentratie toegevoegd. Nadat eenigen tijd in een grooten vloeistofthermostaat door zeer langzaam rondwentelen geschud was, werd 1 c.M<sup>3</sup>. van de te onderzoeken leboplossing toegevoegd en het schudden gedurende 18 à 24 uren voortgezet. Gelijkijdig werden blancoproeven aangezet, waarbij dus 1 c.M<sup>3</sup>. van de vooraf verhitte enzymoplossing werd gebruikt. Na verloop van het gewenschte aantal uren werd gefiltreerd door een met asbest geprepareerde Goochsche kroes, waarbij slechts geringe zuiging plaats vond, om de filtreerende laag niet te verstopen. In een gedeelte van het *volkomen* heldere filtraat werd dan de stikstof volgens KJELDAHL bepaald. De bijzonderheden omtrent de gebruikte preparaten worden bij iedere proef afzonderlijk opgegeven.

### Proef 1.

Stremselpoeder van HANSEN werd in HCl 0,18 pct. opgelost en gedurende  $2 \times 24$  uren tegen herhaaldelijk ververscht zoutzuur van dezelfde sterkte gedialyseerd. De heldere vloeistof werd op dezelfde enzymconcentratie gebracht (door de stremproef) als een oplossing van varkenspepsine volgens PEKELHARING<sup>2)</sup> in hetzelfde zoutzuur. Met deze oplossingen werd nu ook de boven omschreven verteringsproef uitgevoerd. Hier volgen de uitkomsten.

1) Onderzoekingen over het Edammerkaasrijpingsproces. Deze verslagen n<sup>o</sup>. VII, 1910.

2) Zeitschr. für Physiol. Chemie. Bd. 22, bldz. 233.

Temp. 20° C.	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. zuur per 15 filtraat	Blanco	Verteerd (in c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. zuur)	Stremtijd in sec.
Varken . . . . .	17,9	1,3	16,6	60
Kalf (HANSEN) . . . . .	16,7	1,6	15,1	61

Ofschoon dus hier gebruik gemaakt werd van twee preparaten, die in ander opzicht enorm uiteenloopen, blijkt het verterend vermogen van beide ten opzichte van kaasstof niet sterk te verschillen. Opgemerkt dient nog te worden, dat hier gebruik gemaakt werd van uitgewasschen wrongel, die door toevoegen van verdund melkzuur op het waterstofionengehalte  $\pm 10^{-5}$  n. was gebracht. Het groote verschil in pepsinegehalte blijkt nog uit de vertering van kippen-eiwit volgens MERTT:

kalf . . . . .	0,6 m.M.
varken . . . . .	5,5 m.M.

zodat volgens de bestaande opvattingen, het varkenspreparaat  $\frac{5,5^2}{0,6^2} = 84 \times$  meer pepsine bevat. 1)

### Proef 2.

Zelfde enzympreparaten. Caseïne Merck, in 0,005 n. HCl.

c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 20 filtraat.	
Kalf . . . . .	24,5
varken . . . . .	23,5

Hier werden door toevallige omstandigheden geen blanco proeven aangezet; zooals uit proef 1 blijkt, loopen de waarden daarvoor voor beide enzymen uiterst weinig uiteen. Dit blijkt ook uit de verdere proeven. Ook hier ten naastenbij gelijke vertering dus.

### Proef 3.

Een oplossing van stremselpoeder van HANSEN in HCl van 0,18 pct., werd volgens de methode van RAKOCZY <sup>2)</sup> gedialyseerd, waarbij volgens dien onderzoeker de pepsine zich in het daarbij ontstaande neerslag verzamelt, terwijl de chymosine opgelost blijft. Het neerslag werd afgescheiden en opgelost en de beide enzymoplossingen (ik noem ze „neerslag” en „filtraat”) op ongeveer gelijke stremkracht gebracht en nu de vertering van caseïne bepaald in  $\frac{1}{3}$  n. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dat door vermengen van normaal H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> met Na OH-oplossing was verkregen.

1) Bij een vorige gelegenheid heb ik er op gewezen, dat de verschillende argumenten, die tegen de opvatting der identiteit van pepsine en chymosine werden aangevoerd niet steekhoudend zijn. Sedert dien tijd zijn verschillende nieuwe feiten aangebracht, die echter geenszins de dualiteit bewijzen. In het Zeitschr. f. Physiol. Ch. kom ik op dit onderwerp nog nader terug.

2) Zeitschr. für Physiol. Chemie. Bd. 68 (1910) 421.

De H-ionenconcentratie daarvan bedraagt ongeveer  $0,8 \times 10^{-5}$  n. Geschud gedurende 40 uren bij  $19,5^{\circ}$  C.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> per 25 filtr.	Blanco.	Ver- teerd.	Stremtijd in sec.	Vertering volgens Mett.
Neerslag . . .	21,6	1,9	19,7	29,5	8,0 m.M. in 16 uren.
Filtraat . . .	19,85	1,8	18,05	32,5	3,8 " " 16 "

Hieruit blijkt dus, dat, ofschoon de vertering van kippeneiwit volgens METT voor het neerslag (Pepsine volgens RAKOCZY)  $\frac{8^2}{3,8^2} = 4,4 \times$  grooter is dan die voor het filtraat (chymosine), de vertering van de kaasstof parallel gaat aan het stremmend vermogen. Zooals later echter blijken zal, is de verteerde hoeveelheid kaasstof niet evenredig aan de concentratie van het gebruikte enzym, maar aan de wortel daaruit, zooals ook voor de vertering van kippeneiwit door pepsine gevonden is, (SCHÜTZ. BORISSOWSCHE regel.)

Uit bovenstaande uitkomst laat zich dan de verteerde hoeveelheid van het „neerslag” uit die van het „filtraat” berekenen:

$$\frac{\sqrt{29,5}}{\sqrt{32,5}} = \frac{18,05}{x} \text{ of } X = 19,0 \text{ c.M}^3. \text{ Gevonden werd } 19,7 \text{ c.M}^3.$$

#### Proef 4.

Hetzelfde als onder 3, alleen werd bij  $35^{\circ}$  C. gedurende ongeveer 22 uren geschud.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> per 25 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	
Neerslag . . .	24,1	1,55	22,55	21,6	29,5
Filtraat . . .	22,6	2,05	20,55	20,55	32,5

#### Proef 5.

Hierbij werd het verterend vermogen vergeleken van een door mijzelf bereid kalfsmaagextract volgens HAMMARSTEN met dat van een oplossing van pepsine PEKELHARING. De vertering geschiedde in een oplossing van zoutzuur, waaraan Na acetaat was toegevoegd. De waterstofionenconcentratie bedroeg ongeveer 0,000235 norm.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> per 25 filtraat.	Blanco.	Verteerd		Stremtijd in sec.	Vertering volgens Mett.
			Gev.	Ber.		
Kalf . . .	26,5	2,2	24,3	24,3	35	2,9 m.M.
Varken . . .	30,7	2,3	28,4	26,3	30	5,0 "

#### Proef 6.

Hetzelfde als bij proef 5.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> per 25 filtraat.	Blanco.	Verteerd		Stremtijd in sec.	Vertering volgens Mett.
			Gev.	Ber.		
Kalf . . .	34,0	2,2	31,8	31,8	115	2,9 m.M.
Varken . . .	40,2	2,3	37,9	31,8	115	5,0 "

## Proef 7.

Zelfde proef als bij 6, maar andere oplossingen.

	c M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> per 25 filtraat.	Blanco.	Verteerd Gev.	Ber.	Stremtijd in sec.	Vertering volgens Mett.
Kalf. . .	24,6	2,2	22,4	22,4	121	3,0 m.M.
Varken .	27,8	2,2	25,6	23,4	114	5,8 „

Deze proeven, die niet anders zijn dan een uitbreiding van mijne vroegere <sup>1)</sup> onderzoeken leeren dus, dat bij vergelijking van kalfsmaagextract met de meest zuivere pepsine, die tot nu toe bereid is (het preparaat was door Prof. PEKELHARING zelf bereid) toch een nagenoeg parallel gaan van stremmend en verterend vermogen wordt gevonden. Wel is waar zijn de afwijkingen van de berekende en gevonden waarden in proef 5, 6 en 7 wat groot, maar daarvoor is reeds vroeger een zeer aannemelijke verklaring gevonden, waarop ik een oogenblik nader wil ingaan, omdat ze misschien verband houdt met de reeds genoemde bevinding, dat de verhouding van de stremtijden van 2 stremfels niet geheel onafhankelijk schijnt te zijn van den aard van de melk. Ieder, die gewerkt heeft met de gezuiverde varkenspepsine is het bekend, dat dit preparaat uiterst gevoelig is voor hydroxylionen, waardoor het snel vernietigd wordt. Brengt men nu melk door middel van zulk gezuiverd enzym tot stolling, dan zal het van de meerdere of mindere hoeveelheid hydroxylionen der melk en van de temperatuur afhangen of *gedurende* de stremproef een gedeelte vernield zal worden, ja of neen. En ook de verdunning van het enzym is hierbij van grooten invloed: hoe meer verdund de oplossing is, des te sterker wordt het door de hydroxylionen aangetast. Zóó is ook het bij de physiologen algemeen bekende feit te verklaren, dat de parachymosine (zoo noemt men de varkenspepsine) de verdunningswet (stremtijd omgekeerd evenredig met enzymconcentratie) niet volgt.

Het enzym der kalfsmaag is in dit opzicht minder gevoelig, maar toch gaat een verdunde oplossing daarvan soms snel achteruit, indien de vloeistof alkalisch reageert. Reeds vroeger <sup>2)</sup> heb ik op deze omstandigheid gewezen en het is niet onmogelijk, ja zelfs waarschijnlijk, dat het vinden van een niet constante verhouding voor de sterkte van 2 stremfels, waarvan hierboven sprake was, ten deele moet worden toegeschreven aan beschadigingen van het enzym gedurende het experimenteeren. Zoo is het b.v. opvallend, dat bij de vergelijking der 2 stremfelpoeders van tabel IV, de afwijking in de zeer heete maanden Juli, Augustus en September van het jaar 1911 verreweg het grootste was. De reactie van de oplossing van dit poeder

<sup>1)</sup> l. c.

<sup>2)</sup> Over een gebrek van handelsstremfel. Deze verslagen n<sup>o</sup>. VII, 1910.

was alkalisch ten opzichte van rosolzuur, zoodat het waarschijnlijk is, dat bij de hooge temperatuur van het gebruikte gedestilleerde water, in die maanden het enzym wat te lijden heeft gehad. In October bleek namelijk de sterkte weer normaal te zijn, zoodat 't waargenomen verschijnsel niet aan verzwakking van het vaste enzym is toe te schrijven.

Deze eigenschap van varkenspepsine om door alkali zoo sterk beïnvloed te worden en wel des te sterker naarmate de temperatuur, waarbij de stremming plaats vindt, hooger is, volgt duidelijk uit een reeds vroeger<sup>1)</sup> medegedeelde proef.

1 c.M<sup>3</sup> van de oplossing in HCl 0,2 pct. werd verdund in het eene geval met 2 c.M<sup>3</sup>. HCl van dezelfde concentratie, in het andere geval met 1 c.M<sup>3</sup>. HCl 0,2 pct. en 1 c.M<sup>3</sup>. water, zoodat voor beide vloeistoffen de enzymconcentratie dezelfde was. Nu werd melk gestremd (1 : 20) bij 37,5° C. en bij 25,5° C.

Bij 37,5° C. werd gevonden: 97'' voor de eerste en 220'' voor de tweede oplossing

Bij 25,5° C. werd gevonden: 5' 20'' voor de eerste en 6' 54'' voor de tweede oplossing.

Dat de eerste oplossing bij 37,5° C. de melk sneller moest doen stollen dan de tweede wegens de meerdere hoeveelheid zuur, die ze bevatte, lag voor de hand, maar een zóó groot verschil kon niet worden verwacht op grond van mijn vroegere onderzoekingen<sup>2)</sup> over de stremming door leb. Maar het langzame stremmen door de tweede oplossing is in hoofdzaak een gevolg van de beschadiging van het enzym in deze minder zure vloeistof. Dit blijkt duidelijk uit de cijfers, die bij 25,5° C. werden gevonden en die ten naastenbij zich omgekeerd verhouden als de H-ionen concentratie, die voor beide oplossingen kon worden geschat.<sup>3)</sup>

Rakoczy (l. c.) geeft in zijn verhandeling bij de bespreking van mijne uitkomsten op dit punt, welke hij bevestigd vond, een andere verklaring van het betrekkelijk zooveel sneller stremmen bij lager temperaturen. De dualisten nemen n.l. zoowel een chymosine- als een pepsinestremming aan, de laatste niet in neutrale oplossing. Voor de chymosine wordt juist de stollende werking in neutrale oplossing karakteristiek genoemd. Om nu de door mij gevonden verschijnselen, die ik aan gedeeltelijke vernieling van het enzym meen te moeten toeschrijven, te verklaren, neemt R. aan, dat de pepsinestremming sneller zou verlopen bij 25° C. dan bij 37,5° C. Dit lijkt echter zeer onwaarschijnlijk, want het zou beteekenen, dat de optimumtemp. veel lager dan de lichaamstemp. zou zijn gelegen. Er is geen enkele reden om dit aan te nemen. Maar bovendien blijkt, dat juist onder de omstandigheden, die de pepsinestremming begunstigen volgens de

1) Over de enzymen van het stremsel. Deze verslagen n<sup>o</sup>. VIII, 1910.

2) Onderzoekingen over de leb-stremming. Deze verslagen n<sup>o</sup>. V, 1909.

3) l. c.

dualisten n.l. bij de werking in een zuur medium, de stremming door pepsine bij 37,5° C. veel sneller intreedt dan bij 25° C. Verschillende waarnemingen maken deze opvatting zeer onwaarschijnlijk. Zonder hier verder op de kwestie der identiteit van pepsine en chymosine te kunnen ingaan, meen ik, zolang geen andere aanneembelijke verklaring van deze verschijnselen is gegeven, me aan de mijne te moeten houden.

Voor de proeven over de vertering van de kaasstof in verband met den stremtijd is deze eigenschap een zeer ongunstige omstandigheid en de verkregen uitkomsten moeten in dit licht worden beschouwd. Immers, indien bij de stremproef een spoor van het enzym wordt vernield, valt de tijd, voor de stolling benodigd, langer uit dan overeenkomt met de oorspronkelijk aanwezige enzymhoeveelheid en op grond van de stremproef besluiten we tot een enzymgehalte, dat lager is dan de oplossing werkelijk bevat. De verteringsproef, die in betrekkelijk *veel* minder OH-ionenbevattende vloeistof wordt uitgevoerd, en waarbij dus van vernieling van het enzym geen of minder sprake is, zal dan een met betrekking tot de stremproef te hoog cijfer opleveren, zooals bij de boven aangegeven uitkomsten nu eens meer, dan eens minder het geval is. De volgende proeven toonen dit nog nader aan.

#### Proef 8.

Vergelijking van kalfsmaagextract met oplossingen van pepsine PEKELHARING. De blancoproeven konden hier achterwege blijven, omdat het N-gehalte der oplossingen zeer gering was en de hoeveelheid stikstof houdende stoffen, die uit de caseïne in oplossing ging, door talrijke blancobepalingen bij andere proeven bekend was.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat	Blanco	Verteerd		Stremtijd in sec. bij 28° C., 1 : 25 melk
			Gev.	Ber.	
Kalf . .	26,85	3,4	23,45	23,45	90
Varken .	35,7	3,4	32,3	23,45	90

Hierbij zien we dus een zeer groote afwijking van de berekende en de gevonden waarde. Ik had niet anders verwacht, want de vernieling van het enzym gedurende de stremproef verraadt zich altijd door het niet gevolgd worden van de verdunningswet, hetgeen merkbaar is bij het op gelijke sterkte brengen der beide oplossingen. Daarom werd de proef herhaald, echter zóó dat bij 24,5° C. werd gestremd, terwijl bovendien aan de melk, vóór de stremming, 1 c.M<sup>3</sup>  $\frac{1}{20}$  n. HCl werd toegevoegd.

#### Proef 9.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco	Verteerd.		Stremtijd in sec.	Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	bij 24,5° na toe- voeging HCl.	bij 28° C. zonder HCl.
Kalf . .	29,8	3,4	26,4	26,4	59	89
Varken.	35,0	3,4	31,6	26,4	59	110

Ofschoon het verschil hier reeds duidelijk kleiner is, schijnt toch het enzym nog te worden aangetast. Door de toegevoegde hoeveelheid HCl wordt dan ook, dank zij de phosphaten der melk, het OH-ionengehalte niet zeer sterk verminderd, zooals vroegere metingen hebben uitgemaakt.

#### Proef 10.

De proef werd daarom herhaald, nadat de stremtijden waren bepaald bij toevoeging van 3 c.M<sup>3</sup>.  $\frac{1}{20}$  n. HCl aan 25 c.M<sup>3</sup>. melk; de temp. was 25° C.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec. na toevoeging van 3 c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{20}$ n. HCl per 25 melk.
			Gev.	Ber.	
Kalf . . .	29,2	3,4	26,6	26,6	58
Varken . .	32,3	3,4	28,9	26,6	58

Geheel opgeheven is het verschil nog niet, maar de aanname is niet te gewaagd, dat ook thans nog sporen enzym beschadigd worden. Hoe dit ook zij, de groote gevoeligheid, die hier de uitkomsten twijfelachtig zou kunnen maken, mist het kalfsmaagextract en er was dus alle reden, om de verteringsproeven uit te voeren met handelsstremfels, om te zien, of hiermede een beter parallel gaan te constateeren viel. Daartoe liet ik een zestal monsters stremselpoeder van binnen- en buitenlandsche fabrieken komen en vergeleek die, wat stremmend en verterend vermogen betreft met het aan dit proefstation gebruikte normaalstremsel.

#### Proef 11

De vertering had plaats in eene oplossing van  $\frac{1}{10}$  n. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oplossing bij 30° C. Een blancobepaling werd bij deze eerste proef niet uitgevoerd, maar de waarde kon op grond van andere proeven, voor een ander doel, onder dezelfde omstandigheden verricht, op 5 c.M<sup>3</sup>. worden gesteld. De oplossingen werden op bijna volkomen gelijke sterkte gebracht wat het stremmend vermogen betreft.

N <sup>o</sup> .	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	
1 . . . .	26,0	5	21,0	21,0	47
2 . . . .	24,8	5	19,8	20,5	49
3 . . . .	27,2	5	22,2	20,7	48
4 . . . .	25,6	5	20,6	20,3	50
5 . . . .	25,8	5	20,8	21,1	46,5
6 . . . .	25,7	5	20,7	21,0	47

#### Proef 12.

De proef werd met dezelfde monsters herhaald, maar als vloeistof waarin de vertering plaats vond werd genomen een mengsel van

azijnzuur en Na-acetaat, waarvan de H-ionenconcentratie bedroeg:  $2,38 \times 10^{-5}$  n.

No.	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	
1 . . . . .	29,3	4,85	<b>24,45</b>	<b>24,45</b>	98
2 . . . . .	28,6	4,7	23,9	23,7	104
3 . . . . .	31,4	4,7	26,7	24,0	102
4 . . . . .	29,2	4,8	24,4	23,2	109
5 . . . . .	28,9	4,7	24,2	24,0	102
6 . . . . .	28,65	4,5	24,15	23,7	104

### Proef 13.

Als proef 12.

No.	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	
1 . . . . .	26,05	4,5	<b>21,55</b>	<b>21,55</b>	109
2 . . . . .	25,2	4,5	20,7	21,0	115
3 . . . . .	27,85	4,5	23,35	21,1	114
4 . . . . .	26,05	4,5	21,55	20,4	121
5 . . . . .	25,8	4,5	21,3	21,3	112
6 mislukt, wegens springen van het kolfje.					

### Proef 14.

Het zesde monster stremselpoeder, dat later ontvangen werd, leverde bij vergelijking met No. 1 (het normaalstremsel van dit proefstation):

No.	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.		Stremtijd in sec.
			Gev.	Ber.	
1 . . . . .	29,1	4,5	<b>24,6</b>	<b>24,6</b>	67
7 . . . . .	29,65	4,65	25,0	24,25	69

Beschouwen we nu de verkregen cijfers van proef 11, 12, 13 en 14, dan blijkt, dat tusschen de uit den stremtijd berekende en de gevonden cijfers voor de vertering van de kaasstof, zoowel in de oplossing van Natriumhydrophosfaat als in die van natriumacetaat en azijnzuur een bevredigende overeenkomst bestaat, zoodat aan een parallel gaan van vertering en stremming onder deze omstandigheden wel niet langer getwijfeld kan worden. Toch komen een paar afwijkingen voor. No. 3 gaf n.l. in alle gevallen en No. 4 in een paar gevallen te hooge cijfers voor de vertering. De reden daarvan heb ik niet kunnen opsporen, maar opgemerkt moet worden, dat deze beide nummers verreweg de meeste vlokjes bevatten bij de oplossing in water en No. 3 toonde zelfs een grofvlokkige afzetting op den bodem van het kolfje, terwijl de oplossing geel gekleurd was. De overige vloeistoffen waren kleurloos. Een stikstofbepaling volgens



KJELDAHL leverde voor 50 c.M<sup>3</sup>. enzymplossing van hetzelfde enzyim-gehalte, na affiltreeren van de vlokjes:

N <sup>o</sup> .		Ongefiltreerd.
1 . . . . .	0,6 c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . .	1,5 c.M <sup>3</sup> .
2 . . . . .	1,0 " " " " . .	2,8 "
3 . . . . .	3,9 " " " " . .	8,25 "
4 . . . . .	3,2 " " " " . .	4,45 "
5 . . . . .	1,8 " " " " . .	2,75 "
6 . . . . .	1,0 " " " " . .	2,1 "
7 . . . . .	. . . . .	4,6 "

No. 3, die bij de verteringsproef de grootste afwijking geeft, bleek ook volgens deze analyse het sterkst verontreinigd te zijn. Wat nu ook de reden moge zijn van de gevonden afwijkingen, die trouwens niet zoo heel groot zijn, de *vervanging* van de stremproef door de verteringsproef zou blijkbaar geen verbetering zijn, maar dit lag ook niet in de bedoeling. Zooals reeds uitdrukkelijk werd gezegd, komt het erop aan, te kunnen nagaan of in het normaalstremsel in den loop van tijd veranderingen zijn ontstaan wat betreft zijn activiteit, ja of neen en voor *dit* doel zou de verteringsproef zeer zeker aanbeveling verdienen, als de middelbare fout van de vertering door één en hetzelfde stremsel maar klein genoeg is. Voordat ik overga tot de mededeeling van de in dit opzicht verkregen cijfers, moge nog een serie uitkomsten volgen, die met dezelfde 7 stremfels werden verkregen, ongeveer 4 maanden nadat de boven aangegeven proeven werden uitgevoerd en waarbij ik gebruik maakte van de kennis van allerlei kleinigheden, die de veelvuldige proeven me intusschen geleerd hadden.

### Proef 15.

De vertering had weer plaats in het mengsel van natriumacetaat en azijnzuur van een H-ionengehalte van ongeveer  $2,38 \times 10^{-5}$  norm. In plaats van gelijke hoeveelheden van de verschillende *enzymoplossingen* te nemen, werden gelijke *enzymhoeveelheden* in de verteringskolfjes gebracht, waarbij gebruik gemaakt werd van een in 100 deelen verdeelde capillairpipet van 1 c.M<sup>3</sup>. De af te meten hoeveelheden werden berekend uit de gevonden stremtijden. Zoodoende moest ook in alle kolfjes evenveel caseïne verteerd worden.

N <sup>o</sup> .	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	Toegev. enzym- opl. in $\frac{1}{100}$ c.M <sup>3</sup> .	Stremtijd in sec.
1 . . .	26,25	3,1	23,15	100	{ 91 89
2 . . .	26,1	3,1	23,0	74	{ 67 66
3 . . .	30,6	3,15	26,45	88	{ 80 78

N <sup>o</sup> .	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	Toegev. enzym- opl. in $\frac{1}{100}$ c.M <sup>3</sup> .	Stremtijd in sec.
4 . . . .	24,4	3,3	22,5 <sup>1)</sup>	100	{ 101 104
5 . . . .	26,0	3,2	22,8	98,3	{ 84 84
6 . . . .	26,4	3,35	23,05	98,3	{ 84 84
7 . . . .	26,7	3,2	23,5	91,7	{ 88 82

Met uitzondering weer van No 3 is de uitkomst zoo goed als men eischen kan.

### Proef 16.

1 c.M<sup>3</sup>. van een 2 pct. oplossing van het standaardstremsel werd toegevoegd aan 100 c.M<sup>3</sup>. van een mengsel van één deel norm. phosphorzuur, 1 deel norm. NaOH en 1 deel water, dus 100 c.M<sup>3</sup>.  $\frac{1}{3}$  norm. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, waarvan de H-ionenconcentratie bedraagt: ongeveer  $0,8 \times 10^{-5}$  n. en geschud bij 30° C. met 0,5 gram caseïne Op 8 achtereenvolgende dagen werd de proef uitgevoerd, natuurlijk met telkens versch bereide enzymoplossing.

N <sup>o</sup> .	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per filtraat.	Blanco.	Verteerd.
1 . . . .	19,2	0,9	18,3
2 . . . .	19,9	0,9	19,0
3 . . . .	19,5	0,9	18,6
4 . . . .	19,75	0,8	18,95
5 . . . .	19,75	0,8	18,95
6 . . . .	19,7	0,7	19,0
7 . . . .	19,8	0,8	19,0
8 . . . .	19,3	1,0	18,3

Gem. . . . 18,76

F = ± 0,11 of ± 0,58 pct.

Ook deze uitkomst is dus zeer bevredigend te noemen en daarmee is dan ook aangetoond, dat *het mogelijk is, om onafhankelijk van de melk en met een nauwkeurigheid die belangrijk grooter is dan tot nu toe bereikt kon worden, veranderingen in de sterkte van een stremselpoeder te constateeren.*

Nu moest nog worden nagegaan, in hoeverre verschillende caseïne-preparaten afwijkende uitkomsten geven, want, hoewel men in een en hetzelfde laboratorium jaren lang met een zelfde preparaat zou kunnen werken, zou toch op zekeren dag een plotseling schijnbaar verspringen van de sterkte van het enzym het gevolg zijn, indien

<sup>1)</sup> Eigenlijk gevonden 21,1, maar uit de vergelijking  $\sqrt{90} : \sqrt{102,5} = 21,1 : x$  wordt gevonden :  $x = 22,5$ .

de waarde, die door de verteringsproef wordt vastgesteld, afhankelijk bleek van den aard van de gebruikte caseïne. Hier volgen eenige uitkomsten.

#### Proef 17.

Vergelijking van twee preparaten, betrokken van MERCK en KAHLBAUM. 100 c.M<sup>3</sup>.  $\frac{1}{3}$  n. NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> + 1 Gr. watervrije caseïne + 1 c.M<sup>3</sup>. kalfsmaagextract.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
Merck . . . . .	21,2	2,85	18,35
Kahlbaum . . . . .	20,9	2,8	18,1

#### Proef 18.

Dezelfde preparaten werden nu vergeleken met twee, vroeger door mij zelf bereide monsters, die door 3 en 5 maal precipiteeren en oplossen volgens HAMMARSTEN waren verkregen

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
Merck . . . . .	22,95	1,75	21,2
Kahlbaum . . . . .	22,9	2,2	20,7
3 × gezuiverd . . . . .	25,8	2,6	23,2
5 × „ . . . . .	26,5	2,1	24,4

Hier zien we dus een veel sterker vertering van de door mij bereide preparaten dan voor de gekochte. Daarom werden de preparaten van MERCK en KAHLBAUM 2 maal omgeprecipiteerd en vergeleken met de niet behandelde resten.

#### Proef 19.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
Merck niet gezuiverd. . . . .	21,3	2,15	19,15
Kahlb. „ . . . . .	21,2	1,95	19,25
Merck gezuiverd. . . . .	23,1	0,9	22,2
Kahlb. „ . . . . .	23,15	1,3	21,85

We zien dus hier hetzelfde verschijnsel. Tengevolge van de zuivering wordt de vertering versneld en het was dus zaak om na te gaan, of ten slotte een constant cijfer gevonden wordt bij voortgezette zuivering door omprecipiteeren (voor de details hiervan zie later).

#### Proef 20.

Vergelijking van een één-, twee- en driemaal gereinigd product (MERCK) met een reeds vroeger, uit een andere zending (MERCK), 2 × gezuiverde caseïne.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
Prepar. van vroeger . . . . .	20,0	0,65	19,35
1×gezuiverd. . . . .	21,6	0,9	20,7
2× " . . . . .	20,5	0,9	19,6
3× " . . . . .	20,8	0,65	20,15
Herhaling.			
Prepar. van vroeger . . . . .	20,0	0,5	19,5
1×gezuiverd. . . . .	21,6	0,8	20,8
2× " . . . . .	20,55	0,7	19,85
3× " . . . . .	kolffe gesprongen.		

### Proef 21.

Vergelijking van het 3 × gezuiverde product van proef 20, dat gedurende den warmen zomer van 1911 in een stopfleschje in mijn laboratorium gestaan had, met een eveneens 3 × gezuiverd preparaat van een nieuw aangebroken flesch caseïne (MERCCK). In tegenstelling met proef 17, 18, 19 en 20, waar  $\frac{1}{3}$  n. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> werd gebruikt, had hier de vertering plaats in een acetaatmengsel.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
Oude preparaat . . . . .	25,25	1,4	23,85
Nieuwe " . . . . .	26,1	1,65	24,45
Herhaling.			
Oude preparaat . . . . .	24,4	1,0	23,4
Nieuwe " . . . . .	24,6	1,1	23,5

Uit nog meerdere bepalingen, waarvan ik de uitkomsten achterwege laat, kan besloten worden, dat een 3-maal zuiveren van de handelsproducten een preparaat levert, dat tamelijk wel constante uitkomsten geeft, ook na het gedurende ruim een half jaar bewaren. Dit is in zooverre een belangrijk resultaat, dat het nu mogelijk is de sterkte van een stremsel in ieder laboratorium te bepalen en uit te drukken in een maat, die niet onderhevig is aan de schommelingen, zooals de melk die vertoont.

Om echter de methode als een internationaal bruikbare te kunnen aanbevelen, leek het mij wenschelijk, als uitgangspunt een enzymoplossing te nemen, die ieder chemicus zich zelf kan bereiden uit de lebklieren van een pas geslacht kalf. Men behoeft dan aan de herkomst van zoo'n enzym niet te twijfelen en de geheele methode voor de bepaling der stremkracht wordt er door op een meer wetenschappelijke basis gesteld. Te dien einde heb ik nagegaan, hoe de uit verschillende kalfsmagen bereide enzymoplossingen zich bij de verteringsproef hielden en de grootte der middelbare fout bepaald voor een serie metingen met deze oplossingen. Door bemiddeling van den heer directeur van het gemeentelijk abattoir te Amsterdam verschaftte ik me een zevental kalvermagen, die zoo spoedig mogelijk

na het slachten ( $3\frac{1}{2}$  tot 5 uur) werden geprepareerd. (Voor de details, zie later.) De verkregen enzymoplossingen werden na voorzichtige neutralisatie met  $\frac{1}{10}$  n. Na OH geneutraliseerd (lakmoes) en door verdunnen met water ongeveer op de sterkte gebracht van een 1 pct. oplossing van het normaal stremselpoeder. Nu werden weer, met behulp van de verdeelde capillairpipet gelijke *enzymhoeveelheden* toegevoegd aan 100 c.M<sup>3</sup>. acetaatoplossing ( $2,38 \times 10^{-5}$  n. H.), waarin 1 gram caseïne gesuspenderd was.

## Proef 22.

N <sup>o</sup> .	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	$\frac{1}{100}$ c.M <sup>3</sup> . toege- gev. enzymopl.	Stremtijd in sec.
norm. 1 . . .	25,2	3,9(?)	21,3(?)	100	{ 145 145
norm. 2 . . .	25,55	3,4	22,15	100	{ 143 145
1 . . . . .	26,8 <sup>1)</sup>	3,3	22,2 <sup>1)</sup>	90 <sup>1)</sup>	{ (134) 130
2 . . . . .	26,0	3,3	22,7	85	{ 125 124
3 . . . . .	25,5	3,5	22,0	85	{ 123 123
4 . . . . .	26,0	3,4	22,6	79	{ 113 116
5 . . . . .	25,85	3,4	22,45	83	{ 119 122
6 . . . . .	25,8	3,3	22,5	79	{ 113 116
7 . . . . .	24,85	3,4	21,45	85	{ 123 123

Bij de blancobepaling van norm. 1 is waarschijnlijk een aflezingsfout van 0,5 c.M<sup>3</sup>. gemaakt, zooals uit de overige cijfers blijkt. De cijfers van de 4e kolom loopen inderdaad niet sterk uiteen, als men bedenkt, dat hier 7 verschillende preparaten werden onderzocht, en ook de overeenstemming met het normaal stremselpoeder is zeer goed. Voor de middelbare fout van het gemiddelde vonden we hier  $F = \pm 0,11$  c.M<sup>3</sup>. (de eerste waarde op 21,8 c.M<sup>3</sup>. gesteld bij de berekening van het gemiddelde).

Nu moest nog bepaald worden, hoe de vertering afhangt van de enzymconcentratie. Zooals reeds vroeger werd gezegd is de verteerde hoeveelheid caseïne evenredig met den wortel uit de concentratie, zooals uit 't volgende blijkt.

<sup>1)</sup> Bij vergissing werd van n<sup>o</sup>. 1 ook 1 c.M<sup>3</sup>. in plaats van 0,9 c.M<sup>3</sup>. afgemeten, vandaar de hogere vertering van 26,8. Omgerekend op 0,9 c.M<sup>3</sup>. werd de waarde 22,3, zooals in de 4e kolom is aangegeven, gevonden.

## Proef 23.

2 Gr. normaal stremselpoeder werden in 100 c.M<sup>3</sup>. water opgelost. Aan 100 c.M<sup>3</sup>. acetaatmengsel, waarin 3 gram caseïne gesuspendeerd waren, werd toegevoegd 1,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  en  $\frac{1}{4}$  c.M<sup>3</sup>. en de vertering na een zekeren tijd vastgesteld.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 50 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	
			Gev.	Ber.
1 . . . . .	39,0	6,0	<b>33,0</b>	<b>33,0</b>
$\frac{3}{4}$ . . . . .	34,25		28,25	28,7
$\frac{1}{2}$ . . . . .	28,0		22,0	23,4
$\frac{1}{4}$ . . . . .	20,5		14,5	16,5

## Proef 24.

In plaats van 3 gr. caseïne, 0,8 gr. per 100 c.M<sup>3</sup>. acetaatmengsel, 1,25 gr. normaal stremselpoeder per 100 c.M<sup>3</sup>. en daarvan genomen 1,  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$  en  $\frac{1}{4}$  c.M<sup>3</sup>.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	
			Gev.	Ber.
1 . . . . .	27,1	3,4	<b>23,7</b>	<b>23,7</b>
$\frac{3}{4}$ . . . . .	24,0		20,6	20,6
$\frac{1}{2}$ . . . . .	19,7		16,8	16,3
$\frac{1}{4}$ . . . . .	14,3		11,8	10,9

## Proef 25.

Als proef 24, maar de gezuiverde caseïne (zie proef 20) in plaats van de ongezuiverde caseïne MERCK gebruikt.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.	
			Gev.	Ber.
1 . . . . .	28,2	1,5	<b>26,7</b>	<b>26,7</b>
$\frac{3}{4}$ . . . . .	23,75		22,25	23,1
$\frac{1}{2}$ . . . . .	18,8		17,3	18,9
$\frac{1}{4}$ . . . . .	12,5		11,0	13,3

Hoewel de gevonden waarden, vooral voor de grootere verdunningen, regelmatig iets te klein gevonden worden, blijkt toch de wortelregel voor deze vertering tamelijk wel op te gaan. 't Is niet onmogelijk, dat bij de grootere verdunningen het enzym gedurende het 24 uren schudden iets te lijden heeft, waardoor de te lage cijfers verklaard zouden kunnen worden. Ik heb het niet noodig geoordeeld dit nog nader na te gaan, want de overeenstemming is voldoende, om na een orienteerende proef met een onbekend stremsel die concentratie te kunnen vaststellen, die *ongeveer* overeenkomt met de sterkte, die volgens de hieronder nader aangegeven uitvoering der verteringsproef gewenscht is.

Ten slotte bleef nog de vraag te beantwoorden, welke vloeistof voor de verteringsproef de meest geschikte is. Zooals uit de vooraf-

gaande proeven is gebleken, zijn voor het doel zeer verschillende oplossingen bruikbaar, want men vindt opgegeven  $\frac{1}{10}$  n.  $\text{Na H}_2\text{P O}_4$ , 0,005 n.  $\text{H Cl}$ ,  $\frac{1}{3}$  n.  $\text{Na H}_2\text{P O}_4$ , mengsels van zoutzuur en natrium-acetaat en ook azijnzuur en dit laatste zout. Het komt er natuurlijk hier op aan, om zekerheid te hebben, dat men bij de herhaalde bereiding van de oplossing altijd hetzelfde waterstofionengehalte verkrijgt, want zooals vroeger gevonden werd, is de verteringsnelheid daarmee nagenoeg evenredig. Op dien grond vervalt al dadelijk het zoutzuur, want het is practisch volledig gedissocieerd en de onvermijdelijke fout, die men bij de titerstelling maakt, is dus procentisch dezelfde voor het waterstofionengehalte. Bovendien zou men hier bijzondere voorzorgen moeten nemen met het oog op het koolzuurghalte. Zeer veel gebruikt men voor het hier beoogde doel, de samenstelling van een vloeistof van bepaald H-ionengehalte, fosphaatoplossingen. De in den handel voorkomende alcalizouten van het phosphorzuur zijn daarvoor minder gewenscht, maar door vermengen van phosphorzuur en natriumhydroxyde oplossingen van bekende sterkte kan men met groote nauwkeurigheid een bepaalde waterstofionconcentratie telkens weer reproduceeren. Een bezwaar van deze methode is echter, dat de bepaling van het gehalte aan phosphorzuur in een oplossing van dit zuur meer tijd kost en meer ervaring eischt dan een eenvoudige titratie van b.v. azijnzuur. Door MICHAELIS <sup>1)</sup> werd met groote nauwkeurigheid het H-ionengehalte bepaald van een mengsel van 20 c.M<sup>3</sup>. n. azijnzuur, 10 c.M<sup>3</sup>. n.  $\text{Na O H}$  en 70 c.M<sup>3</sup>. water. Dit geeft een zoo goed gedefinieerd waterstofionengehalte, dat 't volgens MICHAELIS aan te bevelen is als contrôle van de  $\frac{1}{10}$  n. calomelelectrode. De electromotorische kracht van een hiermede samengestelde gasketen bedraagt 0,6045 Volt, waaruit het waterstofionengehalte van  $2,38 \times 10^{-5}$  norm. berekend wordt. Deze waarde is in volkomen overeenstemming met de langs geheel anderen weg berekende waarde.

Om na te gaan, in hoeverre met dit mengsel, afkomstig van verschillende bereidingen, bij de verteringsproef en ook voor het H-ionengehalte, constante cijfers worden gevonden, bereidde ik me 3 oplossingen van n.  $\text{Na O H}$  en n. azijnzuur, waarvan dus de titer door afzonderlijke proeven werd vastgesteld. Voor  $\text{Na O H}$  werd genomen:

I.  $\text{Na O H}$  van MERCK werd in warm water opgelost in zoo groote hoeveelheid, dat zich bij afkoelen flink kristallen afzetten. Na eenige dagen werd de heldere vloeistof, die wegens de onoplosbaarheid van  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in deze geconcentreerde loog, practisch als koolzuurvrij is te beschouwen, met uitgekookt gedestilleerd water tot een normaal-oplossing verdund.

<sup>1)</sup> ABDERHALDEN. Handbuch der biochemischen Arbeitmethoden, Bd. V, blz. 529.

II. Dezelfde Na O H (purum in bacill.) werd direct tot de gewenschte sterkte opgelost.

III. Was als I bereid, had echter gedurende eenige weken in een half gevulde maatkolf gestaan.

Met de 3 afzonderlijk bereide azijnzuuroplossingen werden nu 3 mengsels gemaakt, die bij schudden met caseïne en 1 c.M<sup>3</sup>. 1 pct. normaalstremsel, gedurende 24 uren bij 30° C., de volgende cijfers gaven.

Proef 26.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
I . . . . .	28,2	1,4	26,8
II . . . . .	28,2	1,4	26,8
III . . . . .	28,0	1,4	26,6

Ook heb ik de electromotorische kracht van eenige combinaties van deze oplossingen gemeten tegen een paar  $\frac{1}{10}$  n. calomelelectroden, daarbij gebruik makende van hulpmiddelen, die me in staat stellen de metingen op 0,1 m. Volt nauwkeurig te verrichten. Hier volgen de gevonden waarden:

E in Volts.

0,6047

0,6038

0,6043

0,6046

0,6046

0,6042

0,6049

0,6049

Gem. . . . . 0,6046

Deze uitkomsten zijn dus alleszins bevredigend en in uitstekende overeenstemming met de waarde die MICHAELIS aangeeft als gemiddelde van een groot aantal metingen, n.l.  $E = 0,6045$  Volt, met een maximumafwijking van 0,6 milli-Volt van de gemiddelde waarde. Bij mijn proeven bedroeg die 0,8 milli-Volt in één geval, overigens waren de afwijkingen niet grooter dan 0,4 milli-Volt.

Ook de verteringsproef gaf voor de drie verschillende acetaatmengsels uitstekend met elkaar overeenkomende cijfers. Ik voeg hier nog aan toe 3 bepalingen bij dezelfde temperatuur en met gelijken schudduur verricht, waarvan 1 en 2 gelijktijdig, 3 een paar weken later met weer opnieuw bereid azijnzuur werden uitgevoerd.

Proef 27.

	c.M <sup>3</sup> . $\frac{1}{10}$ n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> per 75 filtraat.	Blanco.	Verteerd.
1 . . . . .	28,25	1,5	26,75
2 . . . . .	28,8	1,5	27,3
3 . . . . .	28,2	1,5	26,7



De zes verkregen waarden bij een schudduur van 24 uren bij 30° C. in het boven aangegeven acetaatmengsel zijn dus :

26,8  
26,8  
26,6  
26,75  
27,3  
26,7

Gem. . . . 26,82 ± 0,1. Deze fout bedraagt nog altijd 0,8 pct. van den werkingsgraad.

Het normaalstremsel, dat deze waarde leverde is sedert bijna 2 jaren aan dit proefstation in gebruik. De sterkte bedraagt volgens de stelling op 12 monsters melk : 1 : 101 700. Voor een sterkte 1 : 100 000 zou dan de vertering bedragen hebben 26,6 c.M<sup>3</sup>., en we kunnen dus zeggen :

*Een stremselpoeder van een sterkte 1 : 100 000 levert bij de hierboven gevolgde werkwijze eene hoeveelheid verteringsproducten = 26,5 <sup>1)</sup> c.M<sup>3</sup>. <sup>1</sup>/<sub>10</sub> n. zuur volgens Kjeldahl. Deze waarde kan als internationale maat dienen voor de vaststelling der stremkracht van handelsstremsel. 26,5 is dan het verteringsgetal van het stremsel.*

Op grond van de verkregen cijfers mag, naar ik geloof, deze methode gerust worden aanbevolen als verbetering in de stremkrachtbepaling; in de hoop, dat ze door belanghebbende vakgenooten gecontroleerd worden zal, geef ik ten slotte nog een gedetailleerde beschrijving van de wijze van uitvoering ervan, met opgave van de bijzonderheden, waarop te letten valt, ook bij de keuze van het poeder.

#### Vaststelling der stremkracht van het normaalstremsel.

Men begint met te onderzoeken of het te gebruiken poeder eene heldere oplossing in water geeft (1 à 2 pct.) en of zich daarin niet te groote en talrijke vlokjes afzetten. De stremkracht van zoo'n oplossing moet bij kamertemperatuur *minstens* een paar uren volkomen constant blijven, wat door stremproeven met dezelfde melk kan worden gecontroleerd. In het algemeen zal daarvoor een niet alkalische reactie der oplossing noodig blijken; ik vond echter ook poeders, die ten opzichte van rosolzuur zwak alkalisch waren en toch aan den in dit opzicht gestelden eisch voldeden. Thans moet worden nagegaan, of bij vergelijking met een of meer monsters kalfsmaagextract (of andere stremselpoeders) vertering en stremming parallel gaan. Eerst wordt, ter benadering van de concentratie een verteringsproef verricht (zie hieronder) met b.v. een 1 pct. oplossing en dan door middel van den wortelregel nagegaan, hoe sterk de stremseloplossing

<sup>1)</sup> Er is natuurlijk niets tegen om 26,5 in plaats van 26,6 vast te stellen.

moet genomen worden, om voor  $75 \text{ c.M}^3$ . filtraat  $\pm 26,5 \text{ c.M}^3$ .  $\frac{1}{10}$  n. zuur volgens KJELDAHL noodig te hebben. Is deze sterkte berekend, dan wordt de stremtijd van een of meer kalfsmaagextracten door verdunnen gelijk gemaakt aan dien van de stremseloplossing en de verteringsproef uitgevoerd onder de voorgeschreven omstandigheden. <sup>1)</sup> Gaan vertering en stremming voldoende parallel, dan herhaalt men de proef een of tweemaal met het stremsel en berekent met behulp van den wortelregel de sterkte van het enzym uit de vastgestelde waarde  $26,5 \text{ c.M}^3$ . voor een stremsel van 1:100000 in een 1 pct. oplossing. Tegen de toepassing van den wortelregel is op grond van de vroeger medegedeelde cijfers geen bezwaar, indien men zorgt, dat het gevonden aantal  $\text{c.M}^3$ .  $\frac{1}{10}$  n. zuur niet veel, b.v. niet meer dan  $1,5 \text{ c.M}^3$ . van de  $26,5$  afwijkt.

De verteringsproef wordt als volgt uitgevoerd. In een  $100 \text{ c.M}^3$ . kolfje van Jenaglas met nauwe hals wordt zóóveel caseïne gewogen, als overeenkomt met  $0,8 \text{ gr.}$  watervrij product (door de methode van KJELDAHL met factor  $6,37$  vast te stellen). Men voegt uit een nauwkeurig geijkte pipet  $100 \text{ c.M}^3$ . acetaatmengsel toe (zie hieronder) onder regelmatig omzwenken van het kolfje, daarbij er voor zorg dragende, dat geen luchtbellen van eenige betekenis ontstaan. Een tweede kolfje wordt op dezelfde wijze voorbereid. Men plaatst de kolfjes in klemmen, die op een asje in een vloeistofthermostaat van  $30^\circ \text{ C.}$  zijn aangebracht en laat ze gedurende een paar uren rondwentelen, ongeveer  $12$  maal in de minuut. Aan dit getal behoeft men zich niet zoo erg precies te houden, maar te groote snelheid is te vermijden. Daarna laat men eenigen tijd bezinken (waardoor ook het schuim vermindert <sup>2)</sup>) en voegt aan het eene kolfje toe  $1 \text{ c.M}^3$ . <sup>3)</sup> van de te onderzoeken stremseloplossing en aan het andere  $1 \text{ c.M}^3$ . van dezelfde, maar tevoren gedurende ongeveer  $15$  minuten op  $90$  à  $100^\circ \text{ C.}$  verhitte, oplossing. <sup>4)</sup> Men brengt de kolfjes in den thermostaat terug, om na precies  $24$  uren in het filtraat de stikstof volgens KJELDAHL te bepalen. De filtratie behoeft niet bij  $30^\circ \text{ C.}$  te geschieden. Een Goochsche kroes met de bekende daarvoor bereide

<sup>1)</sup> De stremtijden zullen in den regel niet volmaakt gelijk zijn. Men gebruike dan een zorgvuldig geijkte capillairpipet van  $1 \text{ c.M}^3$ ., die in  $\frac{1}{10} \text{ c.M}^3$ . verdeeld is, en voege gelijke *enzym*-hoeveelheden toe. De verteerde hoeveelheden moeten dan aan elkaar gelijk gevonden worden. (Zie proef 22.)

<sup>2)</sup> Het is bepaald noodig, om in kolfjes van  $100 \text{ c.M}^3$ . te werken. Er mag n.l. zoo min mogelijk schuim ontstaan, want daardoor vermindert de concentratie van het enzym *in* de vloeistof. Het volume lucht bedroeg in mijn kolfjes, hoogstens  $2 \text{ c.M}^3$ .

<sup>3)</sup> De uitvloeitijd moet minstens  $20$  seconden bedragen.

<sup>4)</sup> Het spreekt vanzelf, dat alle vloeistof bij dit verwarmen die temperatuur moet hebben. Men vulle de te verhitten vloeistof in een reageerbuisje door middel van een nauw buisje, zonder de wanden aan te raken, opdat niet een fractie van een druppeltje aan de verhitting onttrokken wordt, waardoor foutieve uitkomsten ontstaan zouden.

asbest (MÉRCK) geeft uitstekende resultaten. Mits niet te hard wordt aangezogen, is de geheele vloeistof in 3 à 4 minuten gefiltreerd; ze moet volkomen helder zijn. Bij mijne proeven werden de kolfjes 5 minuten vóódat de 24 uren verstreken waren, in den termostaat te bezinken gezet. Bij het aanzetten van meerdere proeven tegelijk, zal men natuurlijk rekening moeten houden met den voor het filtreren benodigden tijd 75 c.M<sup>3</sup> van het filtraat worden volgens KJELDAHL behandeld.

#### Het acetaatmengsel.

20 c.M<sup>3</sup>. norm. azijnzuur + 10 c.M<sup>3</sup>. norm. loog, beide nauwkeurig gesteld, worden met uitgekookt gedestilleerd water tot 100 c.M<sup>3</sup>. aangevuld.

#### Het kalfsmaagextract.

De lebmaag wordt van de darm en de andere magen afgeknipt, opengesneden en op een plankje gespannen en met stroomend water degelijk gewasschen, zorg dragende, dat het water goed tusschen alle plooiën doorvloeit om de spijsresten volledig te verwijderen. Men laat het water zooveel mogelijk afvloeien, door het plankje vertikaal te plaatsen, en schraapt daarna de lebklieren voorzichtig af met den rand van een horlogeglas. De verkregen massa wordt dan bij lage temp. (4 tot 8° C.) gedigereerd met het zesvoudige gewicht HCl 0,2 pct, gedurende 24 tot 48 uren en door een vouwfilter gefiltreerd. Soms is de vloeistof iets slijmig, maar dit is geen bezwaar voor het doel. Zodoende krijgt men oplossingen, die vrij wat sterker zijn dan een 1 pct. oplossing, van een stremsel 1 : 100 000. Het neutraliseeren kan geschieden door  $\frac{1}{10}$  n. NaOH, maar natuurlijk eerst dan, als de oplossing gebruikt moet worden. Het is noodig de loog slechts druppel voor druppel te laten toevloeien; als indicator is lakmoes geschikt. Men gebruike echter niet de lakmoeshoudende oplossingen. De zoutzure enzymoplossingen blijven weken lang goed, als men ze in een ijskast bewaart. Voor de hier bedoelde proef late men ze niet ouder worden dan een paar weken. Op den duur worden ze n.l. gevoeliger voor alcali. De geneutraliseerde oplossingen zijn in den regel iets troebel.

#### Het reinigen van de caseïne.

Dit moet met groote zorgvuldigheid geschieden. 50 à 60 Gram (MÉRCK of KAHLBAUM) werden in ongeveer 8 L gedestilleerd water gesuspendeerd en door middel van een electromotor zeer krachtig geroerd, terwijl druppelsgewijze  $\frac{1}{5}$  n. NaOH toevloede. Per gram watervrij preparaat is 2,8 à 2,9 c.M<sup>3</sup>. loog noodig om een tegenover lakmoes zwak zure oplossing te krijgen. Door gevoelig lakmoespapier moet men zich overtuigen, dat de reactie gedurende het oplossen voortdurend zwak zuur is. De zwak opalesceerende vloeistof wordt

door een zuigfilter gefiltreerd, waarbij van filtreerpapierbrij als filterlaag gebruik gemaakt wordt. Een laag van 2 à 3 c.M. hoogte geeft een uitstekend filtraat en er heeft geen verstopping van het filter plaats. De verkregen oplossing van natriumcaseïnaat wordt nu door azijnzuur geprecipiteerd, dat men uit een scheidtrechter, waarvan de uitstroomingsbuis even onder de oppervlakte van de krachtig geroerde vloeistof moet uitkomen, laat toevloeien. Men krijgt zodoende geen schuim, waarin zich anders deeltjes afzetten, die spoedig eenigzins hard worden. De volledige precipitatie verraadt zich duidelijk door het snelle samenballen der vlokken als men den motor even stil zet; de bovenstaande vloeistof mag slechts zwak opalesceeren. Na 6-maal decanteeren met gedestilleerd water (geen leidingwater!) wordt de massa op neteldoek gebracht en na eenig uitlekken in een mortier geruimen tijd aangewreven, daarna nog eenmaal in gedestilleerd water gesuspendeerd, dat afgeheveld wordt, om dan voor de tweede en derde maal aan dezelfde bewerking onderworpen te worden. Dan wordt onder voortdurend wrijven in een mortier langzaam alcohol toegevoegd, waarmede nog 2 of 3-maal wordt gedecanteerd. De op een zuigtrechter afgezogen massa wordt in ether gebracht en na een paar malen decanteeren, na 24 uren afgefiltreerd en eenige dagen aan de lucht gedroogd. Het poeder mag niet aanvoelen als fijn zand; daarin onderscheidde het zich bij de door mij verrichte bereidingen altijd van het uitgangsmateriaal. Vóór het gebruik voor de verteringsproef werd het preparaat gezeefd door fijn kopergaas (voor Thomasslakkenmeel gebruikt).

### **Ueber die Bestimmung des Wirkungswertes von Handelslab.**

*(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).*

Es wurde die bisher übliche Methode von DEVARDA zur Bestimmung des Wirkungswertes von Handelslab kritisch besprochen. An Hand von Zahlen aus der Litteratur und von Untersuchungen, die in der Controllabteilung der Versuchsstation Hoorn ausgeführt wurden, konnte festgestellt werden, dasz bei der „Titerstellung“ des Normallabs so grosze Fehler gemacht werden (bis 5,9 pct), dasz die Methode als durchaus ungenügend betrachtet werden musz. Die Thatsache, dasz man nicht im Stande ist selbst bedeutende Aenderungen in der Stärke des Normallabs mit Sicherheit fest zu stellen, liesz eine Untersuchung nach der Möglichkeit um die Labstärke in ein leicht reproduzierbares Mass aus zu drücken, als wünschenswert erscheinen. Die Untersuchungen über die Enzyme des Labs hatten gelehrt, dasz die Verdauung des Paracaseïns bei niedrigen Wasserstoffionenconcentrationen (etwa  $1 \times 10^{-5}$  norm., wie für Edamerkäse

gefunden wird) der coagulierenden Kraft des Labenzymns nahezu parallel geht. In zahlreichen Versuchen wurde gezeigt, dass dem wirklich so ist, und selbst beim Vergleich von Kalbsmagesinfusionen mit möglichst reinem Pepsin findet man nur geringe Abweichungen von der Parallelität, und diese konnten noch sehr gut erklärt werden. Bei Versuchen mit 7 verschiedenen Mustern von Labpulver wurde, mit einer Ausnahme für ein offenbar schlecht vorbereitetes Product, eine vollkommene Parallelität für Gerinnung und Verdauung (bei  $2,37 \times 10^{-5}$  n H) constatirt. Mit noch grösserer Schärfe traf dies zu bei 7 aus Kalbsmägen nach HAMMARSTEN dargestellten Infusionen, die nicht nur unter sich, sondern auch im Vergleich mit Handelslab völlig übereinstimmende Zahlen lieferten. Es wurde dann auf Grund dieser Eigenschaft eine Methode ausgearbeitet, welche es gestattet, die Stärke eines Normallabs überall unter genau reprozierbaren Umständen fest zu stellen, d. h. es wurde eine international verwendbare Methode gefunden, die bisher fehlte.

Von der Stärke des hiesigen Normallabpulvers (das noch mit einem Fehler von 3 pct. behaftet sein kann) ausgehend, wurde gefunden, dass ein Lab 1 : 100 000 unter den oben genau umschriebenen Umständen die Verdauungszahl 26,5 gibt, die ich als Grundmasz für die Labstärke vorschlage.

---