

RIJKSLANDBOUWSTATION HOORN.

Over een onder lebinvloed in de melk verschijnende draadvormige stof.

DOOR

E. HEKMA.

(Ingezonden 13 April 1922).

Zooals uit de in een voorgaand artikel meegeedeelde uitkomsten van onderzoek is gebleken, ligt aan de totstandkoming van het lebstolsel behalve de vorming van een samenhangend melkplaatjesweefsel een homogene draadvormige substantie ten grondslag. De vraag, met welke stof men hier te doen moest hebben, was om tweeërlei redenen van beteekenis.

In de eerste plaats met het oog op de benadering van den aard van het lebstremmingsproces als zoodanig; en in de tweede plaats uit een oogpunt van een nadere kennis omtrent de aangrijpingspunten, die de rijpingsenzymen en fermenten in de kaas ten dienste staan. Onder de aangrijpingspunten, resp. de grondstoffen voor de rijping, nemen toch ongetwijfeld de eiwitstoffen een zeer belangrijke plaats in.

Hoewel nu gebleken is dat, voor zoover de eiwitstoffen betreft, de melkplaatjes een overwegend aandeel in de samenstelling der versch gevormde kaas moeten nemen, zoo schijnt het toch niet overbodig om, mede langs den weg van de bestudeering van de zich bij de lebstremming afspelende verschijnselen en processen, te trachten een meer nauwkeurige kennis te verkrijgen omtrent de eiwitstoffen, die overigens aan de samenstelling der kaas deelnemen.

Wat nu den naderen aard der onderhavige draadvormige stof betreft, lag het voor de hand daarbij allereerst te denken aan paracaseïne, resp. paracaseïnekalk in den zin van HAMMARSTEN ¹⁾.

Gesteld dat men hiermee inderdaad te doen zou hebben, dan zou de door HAMMARSTEN voorgestane meening, dat de in de melk aanwezige caseïne, resp. caseïnekalk voor het overgrootste deel onder lebinvloed een omzetting zou ondergaan, o.a. onder

¹⁾ HAMMARSTEN-HEDIN. Lehrbuch der Physiol. Chemie 8te Aufl. 1914

vorming van paracaseïne, die als paracaseïnekalk in het lebstolsel en vervolgens in de kaas zou overgaan, geamendeerd kunnen worden. En wel in dier voege dat wel is waar een fractie der caseïne (kalk) in paracaseïne (kalk) zou worden omgezet, maar dat integendeel het overgrootste deel van de in de melk aanwezige caseïne (kalk), met name voorzooover de melkplaatjes betreft, morphologisch als zoodanig in het lebstolsel en vervolgens in de kaas overgaat.

Op deze wijze zouden dan de aan het licht gekomen nieuwe feiten met de desbetreffende leer van HAMMARSTEN, en omgekeerd, op ongedwongen wijze in overeenstemming kunnen worden gebracht, zij het ook dat daarbij omtrent de vraag hoe de paracaseïne (kalk) onder lebinvloed uit caseïnekalk zou ontstaan, als te voren slechts vermoedens zouden kunnen worden geuit. Overigens zou dan de paracaseïne (kalk) bij de totstandkoming der melkplaatjes-vereening een rol kunnen spelen, hetzij in dien zin dat deze substantie voor de melkplaatjes een agglutinine of precipitine zou representeeren, hetzij op die wijze dat zij, tengevolge harer draden-vormende eigenschap, vormgevend bij het met elkaar in contact treden der melkplaatjes zou kunnen werken.

Een dergelijke voorstellingswijze scheen in beginsel wel aan-nemelijk.

Maar men moest zich toch tegelijkertijd voor oogen stellen, dat nóch door HAMMARSTEN zelf, nóch door iemand anders, met be-trekking tot de paracaseïne (kalk) ooit is gewaagd geworden van een dradenvormende stof, laat staan van voor melkplaatjes agglu-tineerende of precipiteerende eigenschappen.

Ook mocht tevens niet worden voorbij gezien, dat anderzijds rekening moest worden gehouden met de omstandigheid, dat het vermogen om in kristallijnen (draden-) vorm te kunnen verschijnen, toekomt aan meerdere stoffen, die uit melkbestanddeelen kunnen ontstaan of geacht worden in de melk voor te komen. Als zoo-danig konden in aanmerking komen:

Vetzuur, *tyrosine* en *fibrine*, en het was dus zaak om eerst na te gaan of men met een dezer stoffen, of wellicht met nog een andere, te doen zou kunnen hebben, alvorens de bovengenoemde voorstellingswijze voetstoots te aanvaarden.

Vetzuur.

Aan de mogelijkheid, dat de draadvormige stof vetzuur zou kunnen zijn, moest gedacht worden, omdat sommige van melk-vet afkomstige vetzuurkristallen den vorm van fijne naalden kunnen aannemen, alsmede dat magarinezuur (een mengsel van stearine-en palmitinezuur) volgens waarnemingen uit de menschelijke pathologie zelfs in den vorm van draadvormige gebogen naaldjes kan verschijnen ¹⁾, terwijl anderdeels het maagslijmvlies, ook van

1) A. PRYER Atlas der mikroskopie am Krankenbette. 3te Aufl. 1891.

nuchtere en zeer jonge dieren, een lipase kan leveren ¹⁾, zoodat in het stremsel derhalve wel een melkvetsplitsend enzym aanwezig zou kunnen zijn.

Intusschen wezen proefnemingen uit, dat de draadvormige stof door behandeling met aether, ook bij verhoogde temperatuur, geen verandering bleek te ondergaan, terwijl door op de mikroskopische stolseltjes $\frac{1}{10}$ n. of wel rookend zoutzuur te laten inwerken zocwel de draadvormige stof als de melkplaatjes spoorloos verdwenen ²⁾. De draadvormige stof was dus blijkbaar geen vetzuur.

Tyrosine

Dit aminozuur kan, naar bekend is, verschijnen in den vorm van zijde glanzende kristalnaalden, die de neiging bezitten om zich tot schoof- en penseelvormige bundels te vereenigen. Nu was onder de in verdund melkplasma te voorschijn te roepen stollingsverschijnselen een dergelijke neiging opgemerkt bij de draadvormige stof. Men kan onder zijne oogen bijwijken de vorming van met melkplaatjes afwisselende draadvormige gedeelten, dus van gekorrelde draadjes, die van uit één punt waaier- of penseelvormig uitstralen, zien ontstaan en groeien. Hetzelfde is trouwens van de fibrine bekend. Overigens was het wel denkbaar, dat tyrosine bij de lebstremming uit caseïne zou kunnen ontstaan, omdat de tyrosine eensdeels een der belangrijkste bouwstenen van het caseïnemolecule vormt en anderdeels vrij gemakkelijk door proteolytische enzymen en fermenten uit de caseïne schijnt te kunnen worden afgesplitst ³⁾.

Dit moet zelfs reeds het geval zijn onder den invloed van proteolytische enzymen en fermenten, die in de kaas hunne werkzaamheid ontvouwen; de tyrosine ontleent immers zelfs zijn naam daaraan, dat het voor het eerst in oude kaas is aangetroffen geworden. Daar nu bedoelde rijpingsenzymen en fermenten althans voor een deel afkomstig moeten zijn van het stremsel, zou het wel verklaarbaar zijn, dat de afsplitsing van tyrosine uit caseïne reeds een aanvang zou nemen bij de lebstremming. Zulks te meer, omdat volgens HAMMARSTEN (l.c.) bij de melklebstolling een proteolytische splitsing van caseïne moet plaats vinden, zij het ook dat HAMMARSTEN tot andere splitsingsproducten kwam. Of bij deze caseïnesplitsing pepsine ⁴⁾ in het spel is dan wel een erepsine, hetzij afkomstig van het maagslijmvlies — wat nog niet bewezen is — hetzij een micro-organische (endo-) erepsine ⁵⁾ is een vraag, waarbij hier niet stilgestaan zal worden, al moge er in dit verband ook op worden gewezen, dat tot de weinige native eiwit-

¹⁾ Litt bij: C. OPPENHEIMER Die Fermente Bd. I 4te Aufl. 1913.

²⁾ Voor andere zoutzuurconcentraties dan de genoemde geldt dit niet.

³⁾ Litt O. COHNHEIM Chemie der Eiweisskörper 3te Aufl. 1911.

⁴⁾ W. VAN DAM. Opstellen over moderne Zuivelchemie, Uitgave F.N.Z. 1916.

⁵⁾ ORLA JENSEN. La maturation des fromages. Le Lait 1, 492 (1921).

stoffen, die het erepsine vermag aan te tasten, juist de caseïne behoort ¹⁾).

Hoewel derhalve de vorming van tyrosine bij de lebstolling wel begrijpelijk zou zijn, was, jammer genoeg, de vraag of wij met deze stof bij de onderhavige draadvormige substantie te doen zouden hebben, niet langs directen weg uit te maken, omdat de in aanmerking komende tyrosine reacties ook gelden voor tyrosinehoudende eiwitstoffen, als bijv. caseïne en fibrine. Dit is bijv. het geval met MILLONS reagens, onder welks invloed zoowel de draadvormige substantie als de melkplaatjes bij verhitting rood bleken gekleurd te worden, waaruit althans dit kon worden besloten, dat de draadvormige stof of tyrosine of een tyrosinehoudende eiwitstof moest zijn.

Fibrine.

Er konden enkele argumenten worden aangevoerd, die schenen te wijzen in de richting van een fibrinenatuur der draadvormige stof. In de eerste plaats deed het dradenweefsel, dat in met 1 ‰ chloorcalciumoplossing sterk verdund melkplasma onder lebinvloed te voorschijn kan worden geroepen, meermalen zeer sterk denken aan een weefsel van fibrinedraden, waarop zich amorphe substanties (in casu melkplaatjes) hebben afgezet.

Voorts was herhaaldelijk een plotseling opschieten der draadvormige stof in het gezichtsveld waargenomen, alsmede een zich door „groeien” verlengen der gekorrelde draadjes, terwijl vastgesteld kon worden, dat deze „groei” niet enkel veroorzaakt wordt door een voortgezette rangschikking der melkplaatjes in lengterichting, maar dat daaraan integendeel ook de draadvormige substantie deelneemt.

Dit plotseling opschieten en dit groeien nu is, naar men weet, in hooge mate eigen aan de fibrinenaaldjes en -draden. Dit is niet alleen het geval met de bij gewoon mikroskopisch onderzoek waarneembare fibrinedraden van RANVIER ²⁾ zooals reeds door BIZZAZERO ³⁾ is ontdekt geworden, maar blijktens latere bevindingen ⁴⁾ eveneens met de ultramikroskopisch kleine kristalvormige fibrinenaaldjes, die deels door „groeien” en deels door een zichtbare aaneenschakeling in lengterichting tot de vorming van draadjes aanleiding kunnen geven.

Voorts scheen ook het feit, dat bij de uitscheiding der onderhavige draadvormige substantie kalkzouten een rol kunnen spelen, te pleiten voor derzelver fibrinenatuur, daar hetzelfde immers ook bij deze stof het geval is.

¹⁾ O COHNHEIM, *Chemie der Eiweisskörper* I. c.

H. J. HAMBURGER en E. HEKMA. *Journ. de Physiol. et path. gén* 4, 805, (1901).

²⁾ RANVIER. *Traité technique d'Histologie* Paris 1875.

³⁾ J. BIZZAZERO. *Die Blutplättchen im peptonisirtem Blute* *Centralblatt f. d. Medic. Wissenschaften* 21. 539 (1893).

⁴⁾ Ueber das Fibrin. VI, *Bioch. Zeitschrift* 73. 370 (1910)

Men zou dus inderdaad wel geneigd kunnen zijn tot de aanname, dat de draadvormige stof fibrine zou moeten zijn, in welk geval derhalve de eventueel in het melkplasma aanwezige fibrine onder lebinvloed tot uitscheiding zou worden gebracht. Ook dat scheen niet geheel en al onbegrijpelijk.

Het is immers van ouds bekend ¹⁾, dat fibrinestolling in transudaten- en bloedplasma kan worden te voorschijn geroepen door extracten van verschillende orgaanweefsels.

Welnu, zoo zou men zich kunnen voorstellen, dan zou het niet vreemd zijn, dat door een maagwandextract als het stremsel is, uitscheiding van fibrine in melkplasma zou kunnen plaats vinden.

Dan echter mocht verwacht worden dat ook andere orgaanextracten, dan die van den lebmaagwand, melkstolling teweeg kunnen brengen en ook dat klopte blijkbaar. Want het schijnt dat ook extracten van de pancreasklier deze eigenschap bezitten. Daarbij mocht intusschen niet voorbij worden gezien, dat men bij de aftreksels van den lebmaagwand en de alvleeschklier juist te doen heeft met extracten van proteolytische enzymen leverende klieren. Daar stond evenwel tegenover, dat ook in andere dierlijke organen, om van plantenweefsels niet te spreken, melkstremmende argentia zijn aangetroffen, ja zelfs in bloed ²⁾.

Bij dezen stand van zaken scheen dus een fibrinenatuur der draadvormige stof niet onwaarschijnlijk, maar was niettemin het stringent bewijs daarvoor geenszins geleverd.

Het lag nu voor de hand, om door een onderzoek omtrent het gedrag der draadvormige stof ten opzichte van de fibrinekleuringsmethode volgens WEIGERT, die immers voor deze stof als vrijwel specifiek geldt, te trachten meerdere zekerheid in deze te krijgen. Tot dat doel werd het te onderzoeken materiaal gefixeerd in absolute alcohol, al dan niet na voorafgaande flambeering, terwijl de gefixeerde praeparaten vervolgens aan de inwerking der kleuringsvloeistof werden onderworpen, welke als volgt was samengesteld: 10 druppels eener verzadigde alcoholische methylvioletoplossing in 5 c.c. verzadigd anilineoplossing (= 10 c.c. anilineolie op 100 aq. dest; filtreeren; bij 90 c.c. filtraat 11 c.c. alcohol absol.) Verdere behandeling der praeparaten: $\frac{1}{2}$ minuut in 0,9 pct. chloornatriumoplossing; 5 min. in verdunde Lugoloplossing; differentiatie in anilineolie-xylol, \pm een uur, 4 maal ververschen; xylol, 3 maal ververschen; insluiten in canadabalsem.

Als materiaal werd gebruikt mikroskopische stolseltjes, waarin de draadvormige stof duidelijk aan den dag trad, welke stolseltjes als volgt werden verkregen. Melkplasma werd 10 maal met 1 $\frac{1}{100}$ chloorcalciumoplossing verdund; aan 20 c.c. dezer vloeistof werd een druppel stremsel toegevoegd. Van dit mengsel werd een

¹⁾ A. BUCHANAN. On the Coagulation of the blood and other fibriniferous liquids Proc. Phil. Soc. Glasgow, 2, 16 (1844-45).

²⁾ HAMMARSTEN-HEDIN. Lehrbuch l. c.

druppel gebracht op een dekglas, dat korten tijd bij 37° in de stoof werd geplaatst in een vochtig kamertje. Of wel: op 10 maal met water verdund melkplasma liet men bij 37° C. gedurende eenigen tijd stremsel inwerken, waarna een druppeltje dezer vloeistof op een dekglas werd gebracht en vermengd met een druppeltje een 1 % chloorcalciumoplossing. De gevormde stolseltjes werden gefixeerd en behandeld op de voornoemde wijze.

De uitkomst was eenigszins verrassend. Er werd meermalen een gekleurd dradenwerk verkregen, dat als twee druppels water op elkaar, op een dicht fibrinedradennetwerk geleek. Opmerkelijk was echter, dat dit dradenwerk in het heldere veld duidelijk aan den dag trad en dat van de melkplaatjes als zoodanig weinig meer was te herkennen; deze schenen om zoo te zeggen met de oorspronkelijke draadvormige stof meer of min versmolten te zijn tot eenigszins onregelmatig gecontoureerde draden.

Het was duidelijk, dat de kleuring niet, althans niet alleen, te danken was aan de oorspronkelijk aanwezige draadvormige stof, maar dat daaraan ook de melkplaatjes deelnamen.

Uit dit resultaat moest besloten worden, dat of de WEIGERT methode niet specifiek moest zijn voor fibrine, of wel dat men bij de draadvormige stof inderdaad met fibrine te doen moest hebben en dat bovendien de melkplaatjes fibrine zouden bevatten. Intusschen scheen, wat het laatste punt betreft, de mogelijkheid dat de melkplaatjes fibrine zouden kunnen bevatten niet erg waarschijnlijk. Wel is waar zou de eiwitcomponente of een der eiwitcomponenten van een nuclealbumine als de caseïne is, in beginsel evengoed fibrine als een andere eiwitstof kunnen zijn, maar de in de literatuur neergelegde gegevens ¹⁾ omtrent verichte analyses van caseïne en fibrine wijzen uit dat de eerste eiwitstof geen glyocol onder zijne bouwsteen bevat, de laatste daarentegen wel. Tenzij men derhalve zou mogen aannemen, dat aan de juistheid der fibrineanalyses, hetzij dan doordat met niet voldoende zuiver materiaal zou kunnen zijn gewerkt of uit anderen hoofde, twijfel geoorloofd zou zijn, wat van die van de caseïne als uitgesloten mocht worden beschouwd op grond van de overeenkomstige resultaten van verschillende onderzoekers, lag de gevolgtrekking voor de hand dat uit de melkplaatjes geen fibrine kan ontstaan.

Daardoor kwam de eerstgenoemde mogelijkheid van het niet specifiek zijn der WEIGERT kleuring meer op den voorgrond. Overwogen werd, dat de niet specificiteit der WEIGERT kleuring voor fibrine wellicht daarin zijn oorzaak zou kunnen vinden, dat deze methode in den grond zou kunnen berusten op een reactie met een gemeenschappelijken bouwsteen der fibrine- en caseïnemoleculen, zooals dit immers ook met de reactie van MILLON het geval is, waarbij uiteraard gedacht werd aan tyrosine.

¹⁾ Die men o. a. vindt bij O. COHNHEIM. Chemie der Eiweisskörper 3te Aufl. 1911.

Desbetreffende proefnemingen wezen evenwel uit dat zuivere tyrosine in kristalvorm zich volgens de WEIGERT-methode niet laten kleuren. Met dat al bleef de vraag of wij bij de draadvormige stof met fibrine te doen moesten hebben ja dan neen, voorschands open. Het was dus zaak te trachten langs anderen weg hieromtrent uitsluitel te verkrijgen, waarbij men als vanzelf voor de meer algemeen gestelde vraag kwam te staan, of in de melk fibrine als physiologisch bestanddeel dezer vloeistof aanwezig zou kunnen zijn, welke vraag ik mij voorstel in een volgend artikel onder de oogen te zien.
