

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Over de localisatie van het leb-enzym in gedroogde lebmagen

DOOR

E. HEKMA en E. BROUWER.

(Ingezonden 30 Januari 1923).

De gedroogde kalfsmagen, die voor de stremselbereiding worden gebruikt, vertoonen een zeer verschillend uiterlijk. Men vindt groote en kleine; lichtgeel en vuil-bruin gekleurde; nu eens is de wand dikker, dan weer dunner; soms is het aantal slijmvliesplooien, dat zich aan den binnenkant bevindt, groot, dan weer is het klein en ook de breedte van deze vormsels wisselt zóó sterk, dat men wel moet aannemen, dat dit onderscheid slechts gedeeltelijk is ontstaan door meer of minder sterk opblazen ¹⁾; ook bij de versche maag is het aanwezig geweest.

Deze plooien nu, bestaan hoofdzakelijk uit klierweefsel; ze vormen als het ware een duplicatuur van het maagslijmvlies, dat de geheele binnenvlakte van den maagspierwand (de zoogenaamde muscularis) bekleedt. Men mag wel aannemen, dat ook bij de gedroogde lebmaag, evenals bij de versche, leb zich bevindt in het slijmvlies, terwijl het evenzeer aannemelijk is, dat een ander gedeelte aanwezig is in het op dit slijmvlies ingedroogde secreet. Wanneer men nu overweegt, dat de plooien — in tegenstelling met de andere gedeelten — uitsluitend uit slijmvlies bestaan, dan kan het haast niet anders of deze plooien moeten bij extractie méér leb leveren dan de andere maaggedeelten, die voor een groot deel uit spierweefsel bestaan.

Blijkt bij onderzoek, dat dit inderdaad het geval is, dan ligt ook de veronderstelling voor de hand, dat die magen, welke de meeste en grootste plooien hebben, ook méér leb zullen leveren dan de organen met weinig, kleine plooien. Hieruit volgt, dat het mogelijk zou kunnen zijn zich tennaastenbij een oordeel te vormen over de handelswaarde van een partij lebmagen, door op de plooien te letten.

Ook de andere maaggedeelten mag men niet als gelijkwaardig beschouwen, al bestaat de wand ook overal uit slijmvlies, spierlaag en weivlies. Het klierweefsel toch, van waar de leb afkom-

¹⁾ Dit opstel heeft alleen betrekking op kalfsmagen, die vóór droging zijn opgeblazen.

2082293

stig is, is in histologisch opzicht zeer verschillend al naar de plaats, waar het wordt gevonden.

In dit opzicht bestaat vooral verschil tusschen het fundusgedeelte, d.i. de groote uitbocht, en het pylorusgedeelte, dat bij den uitgang van het orgaan is gelegen. Van versehe kalfslebmagen heeft men herhaaldelijk het slijmvlies van fundus- en van pylorusgedeelte geëxtraheerd om de sterkte der extracten met elkaar te vergelijken. HAMMARSTEN ¹⁾, GLAESNER ²⁾ en met hen de meeste andere schrijvers meenen, dat het pylorusgedeelte zeer arm aan leb is. SOMMER ³⁾ daarentegen houdt het omgekeerde voor waar.

Daar deze onderzoekers met het slijmvlies van versehe magen werkten, mag men hunne conclusies slechts met voorbehoud op de gedroogde lebmagen toepassen. SOXHLET ⁴⁾ meent, dat ook bij de gedroogde organen het pylorusgedeelte zeer arm aan leb moet zijn, waarom hij aanraadt om in de practijk, vóór de extractie, het pylorusgedeelte van de lebmaag af te snijden en weg te werpen. Andere schrijvers, b.v. LEITCH ⁵⁾, deelen deze meening.

Om over bovengenoemde vragen eenigszins georiënteerd te zijn, werden een aantal buitenlandsche en binnenlandsche gedroogde lebmagen, zooals zij voor de stremselfabricage worden gebruikt, onderzocht.

Van deze magen werden de plooiën verwijderd en verzameld, het pylorusgedeelte werd bij de dwars verloopende plooi afgeknipt; soms ook nog een gedeelte vlak bij den maagingang. Daarna werden deze drie of vier gedeelten afzonderlijk in stukjes van circa 1 c.M². geknipt en gedurende 24 uur uitgetrokken met de tienvoudige hoeveelheid NaCl 10 pct., waarna filtratie door gaas of glaswol volgde. De onderstaande getallen geven de sterkte van het extract aan, dus de hoeveelheid melk, die door één deel van het stremsel bij 35° in 40 min. kan worden gecoaguleerd.

Tabel I ⁶⁾.

	Buitenlandsche magen.			Binnenlandsche magen.			
Plooiën	10 300	22 000	2 100	1 900	3 900	5 000	2 500
Pylorus	1 800	830	110	170	390	400	940
Fundus	2 900	5 400	830	250	1 500	2 900	1 800
Gedeelte bij den maagingang.	—	—	1 060	—	2 400	4 700	3 900

1) HAMMARSTEN, Jahresberichte der Tierchemie, 2, S. 118, (1872).

2) GLAESNER, Hofmeisters Beiträge zur chemischen Physiologie, 1, S. 24, (1902).

3) SOMMER, Inaug. Dissertation, Würzburg, 1897.

4) SOXHLET, Milchzeitung, 1877.

5) LEITCH, West of Scotland Agricult. College, Bull. No. 92, 23, (1919).

6) Voor deze, evenals voor de volgende tabellen, werd de sterkte bepaald door vergelijking met een stremselpoederoplossing van bekende sterkte. Steeds werden bij 25 c.c. melk gevoegd 1, ook wel 1½ c.c. oplossing of extract, bij 35° Om fouten door het zout der extracten te vermijden werd het stremselpoeder opgelost in de extractievloeistof. Wanneer verdunning van de extracten noodig was, werd als verdunningsmiddel ook steeds deze vloeistof gebruikt. De verdunning werd zóóver voortgezet, dat de stremtijden van poederoplossing en van extract-verdunning nagenoeg gelijk waren (1½ à 3 min.). Dusdoende konden afwijkingen van de „tijdwet” worden verwaarloosd.

Uit bovenstaande tabel blijkt voldoende, dat de plooien zeer rijk zijn aan leb, het pylorusgedeelte daarentegen bevat betrekkelijk weinig enzym. De overige beide deelen bevatten hoeveelheden, die daartusschen zijn gelegen. (Zeer tegen onze verwachting was, dat het gedeelte bij den ingang van de maag méér enzym bevatte dan het fundusgedeelte). Uit deze beschouwingen volgt, dat men in een plooienrijke maag méér leb zou mogen verwachten dan in een plooienarm orgaan. Dit aan de feiten wenschende te toetsen, moesten wij ons dus een oordeel vormen omtrent het lebgehalte van verschillende magen.

Hiervoor is de tot nu toe gevolgde methode lang niet toereikend. Het bleek al spoedig, dat deze wel is waar een ruwe schatting van de onderlinge verhouding van de hoeveelheid leb in de gedeelten van één maag toelaat; maar dat zij niets leert omtrent de verhouding tusschen verschillende magen. Het verkregen extract n.l., wordt bij laten staan (vooral bij verhoogde temperatuur) voortdurend sterker, zoodat het stremmend vermogen tenslotte vele malen (tot twintig maal) grooter kan zijn dan daarvóór. Deze toename loopt bij verschillende magen zeer uiteen, zoodat de waarden, die onmiddellijk na filtratie worden gevonden, geen maatstaf opleveren voor de sterkte na het activeeren. We hebben daarom een anderen weg moeten kiezen. Voorloopig hielden we ons (met enkele afwijkingen) aan de practijk van de stremselbereiding.

De methode die gevolgd werd, was aldus: Extractievloeistof NaCl 10 pct., boorzuur 1 pct. Duur der extractie 24 uur. De geëxtraheerde stukjes werden opnieuw overgoten en na 24 uur werd de vloeistof wederom afgegoten. Deze bewerking werd herhaald, zoolang er nog een werkzaam extract werd verkregen. Alle extracten werden bij 35° geplaatst en de sterkte er van elken dag bepaald. Met behulp van de grootste waarde werd de totale hoeveelheid enzym berekend. Dit is voor 4 magen uitgevoerd.

Tabel II.

		Aantal.	Gewicht.	Hoeveelheid enzym per gram. 1)	Totale hoeveelheid enzym.	Totale hoeveelheid enzym in pct. uitgedrukt.
1. Buiten- landsche maag.	plooien pylorus rest	11	2,430 G.	45,6	111	10,6
			3,650 „	14,5	53	5,0
			16,440 „	54,0	888	84,4
			22 520 G.		1052	100,0

1) Deze getallen geven de hoeveelheid melk in Liters aan, die door de totale hoeveelheid extract uit één Gram bij 35° gedurende 40' kan worden gestremd; de cijfers werden verkregen door de getallen, die het aantal c.c. van het extract per Gr. maag aangaven, te vermenigvuldigen met die, welke de sterkte aangaven, waarna het product door 1000 werd gedeeld.

		Aantal.	Gewicht.	Hoeveelheid enzym per gram.	Totale hoeveelheid enzym.	Totale hoeveelheid enzym in pct. uitgedrukt.
2. Buiten- landsche maag.	plooiën pylorus rest	12	1,910 G.	745,5	1424	40,9
			6,470 "	52,4	339	9,7
			12,810 "	184,6	1724	49,4
			21,190 G.		3487	100,0
3. Binnen- landsche maag.	plooiën pylorus rest	8	1,000 G.	705,0	705	14,3
			3,070 "	9,8	300	6,1
			13,780 "	283,6	3924	79,6
			17,850 G.		4929	100,0
4. Binnen- landsche maag.	plooiën pylorus rest	14	1,650 G.	308,5	509	36,2
			3,700 "	7,2	27	2,0
			10,900 "	79,7	889	61,8
			16,250 G.		1405	100,0

De tijd, waarna de extracten het maximum hadden bereikt, was zeer wisselend. Soms was het na twee dagen, in andere gevallen pas na 6 dagen. Is de benodigde tijd zóó lang, dan heeft men kans, dat een deel van het enzym weer wordt vernietigd, wat wordt bevorderd door de ontwikkeling van schimmels en bacteriën. Deze methode is dus niet ideaal, want als de activeering zeer lang duurt, dan is men niet zeker, dat men de totale hoeveelheid stremsel nauwkeurig leert kennen. Bovendien is ze tijdrovend, want om van één maag de sterkte van het extract uit plooiën, pylorusgedeelte en rest te leeren kennen, moesten niet minder dan 35×2 bepalingen worden gedaan.

Geen wonder dus, dat naar vereenvoudiging werd gezocht. Wij zijn er in geslaagd deze te vinden door het toepassen van een methode, die berust op de uitkomsten van een aan de 1ste Afdeling van het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn ingesteld onderzoek, waarvan men het verslag aan dit artikel voorafgaande aantreft ¹⁾. Bij genoemd onderzoek was n.l. gebleken, dat de activeering van de lebmaagextracten bij 35° slechts dan in enkele dagen afloopt, wanneer de concentratie aan waterstofionen, dus de zuurheidsgraad van het milieu, een bepaalde waarde heeft overschreden ($P_H \leq 5,2$). Bij hoogerem zuurgraad verloopt deze activeering weliswaar sneller, maar al spoedig ($P_H \pm 4,8$) komt een schadelijke inwerking op het stremmend principe tot uiting. Volmaakt betrouwbare gegevens omtrent de totale hoeveelheid leb in een extract krijgt men dus, wanneer men de activeering

¹⁾ Blz. 60.

laat verlopen bij een concentratie aan waterstofionen, waarvan P_H 4,9 à 5,2 is. (Hierbij is een „zoutfout” niet in rekening gebracht).

De moeilijkheid was nu om de extracten, waarvan we veelal slechts een kleine hoeveelheid tot onze beschikking hadden, op dezen bepaalden zuurgraad te brengen, want vooraf kan men nooit weten, hoeveel zuur daarvoor in deze eiwithoudende media noodig zal zijn.

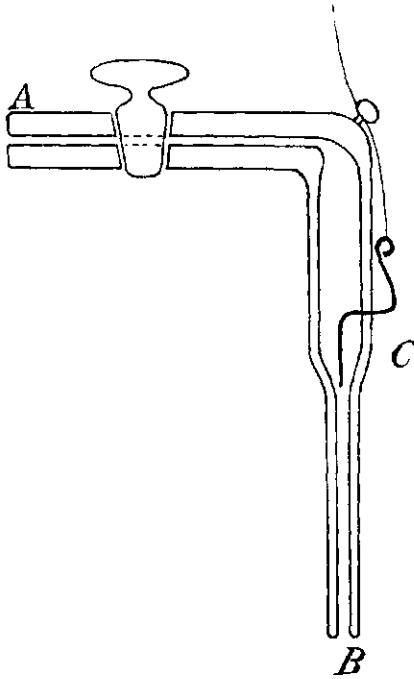
Op aanraden vanwege de 1ste Afdeling van het Rijkslandbouwproefstation wendden we ons tot de electrometrische methode. BARENDRECHT ¹⁾ heeft n.l. voor enkele jaren een waterstofelectrode aangegeven, waarmee het gelukt, kleine hoeveelheden vloeistoffen te titreeren.

Reeds bij voorbaat werd een langzaam instellen van de evenwichten aan de electrode gevreesd en het bleek dan ook spoedig, dat geen nauwkeurige uitkomsten met deze methode kunnen worden verkregen, voorzover het vloeistoffen van een samenstelling als van de onze betreft. Daarom werden de einduitkomsten steeds met een waterstofelectrode van een meer gebruikelijken vorm gecontroleerd, waaruit bleek, dat de methode voor ons doel toch wel ruimschoots toereikend was.

De zuurheidsgraad van het versche extract was bijna altijd te laag. Daarom werd zoutzuur $\frac{1}{25}$ N. bij kleine hoeveelheden toegevoegd en de invloed van deze zuurtoevoeging op den zuurheidsgraad werd telkens met BARENDRECHT's electrode gemeten. Wanneer de gewenschte waarde na enkele toevoegingen was bereikt, werd — na contrôle met een „gewone” electrode — het stremsel bij 35° geplaatst, waarna de sterkte dagelijks werd gemeten.

Een kleine wijziging, die aan de electrode werd aangebracht, is niet van belang ontbloomt. In het horizontale gedeelte (zie fig.) heeft BARENDRECHT n.l. *niet* een kraan. Het uiteinde A wordt verbonden met een gummislangetje, dat van het waterstofapparaat komt. Het uiteinde B doopt men in de te onderzoeken vloeistof, waarna waterstof wordt doorgelaten. Volgt men nu het voorschrift van BARENDRECHT, dan wordt de waterstofstroom afgesloten met een kraan, die zich in den hollen zuiger van een spuit bevindt, waarna men met behulp van de in het systeem ingeschakelde spuit het niveau in de electrode vele malen doet rijzen en dalen om zóóveel koolzuur in het waterstofgas te doen oplossen, dat een evenwicht ontstaat en in de tweede plaats om de zuurstof, die is opgelost in de vloeistof, te reduceeren aan de electrode. Hierna gaat men tot de meting over.

¹⁾ BARENDRECHT, Biochem. Journ. Vol. 9, 66, (1915).



Gedurende het meten diffundeert echter waterstof door den wand van het gummislangetje naar de vrije atmosfeer; het vloeistofniveau bij C zal daardoor voortdurend stijgen, wat bij het meten hinderlijk is. Nu kan men dit stijgen tot een minimum beperken door de gummiverbinding zeer kort te nemen. Beter lijkt het ons in het horizontale been van de electrode een kraantje aan te brengen. Na het doorlaten van de waterstof sluit men op een afstand van enkele centimeters van A de gummislang met een klemmetje af. Door nu op het buisje te drukken kan men het niveau in de electrode willekeurig doen stijgen en dalen, zoodat men de spuit niet noodig heeft. Wanneer de gasuitwisseling heeft plaats gehad, wordt het niveau op een dusdanige hoogte gebracht, dat de punt der platinaelectrode er even onder steekt en nu draait men de kraan dicht; de hoogte van het niveau verandert dan niet noemenswaard meer. Ook in het oorspronkelijk model van WALPOLE, waarvan BARENDRECHT's electrode een vereenvoudiging is, bevindt zich in principe op dezelfde plaats een kraan. Toch had WALPOLE ¹⁾ hinder van waterstofverlies, veroorzaakt door een gummistop, die in BARENDRECHT's apparaat (en dus ook in het onze) is vervallen.

Deze inrichting bleek nog een ander voordeel te hebben. Vóór het aansluiten aan het waterstofapparaat kan men de geheele electrode met de te meten vloeistof door opzuigen vullen en daarna de kraan sluiten. Na verbinden met het waterstofapparaat

¹⁾ WALPOLE, *Bioch. Journ.* Vol. 7, 410, (1913).

en weer openen der kraan wordt de vloeistof uitgedreven en vervangen door zuiver waterstofgas, wat bij den ouden vorm niet direct wordt bereikt. Het bleek ons, dat bij de nieuwe werkwijze de evenwichten zich veel sneller instellen.

Met behulp van de hier beschreven methode hebben we nog een aantal magen onderzocht, n.l. drie buitenlandsche en drie binnenlandsche, eveneens van een stremselfabriek afkomstig.

Wederom werden plooiën, pylorusgedeelte en rest afzonderlijk onderzocht. Alle drie deelen werden in stukjes geknipt en overgoten met een oplossing van NaCl 10 pct., boorzuur 1 pct. Na twee dagen op een koele plaats te hebben gestaan, werd de vloeistof afgegoten en vervangen door een nieuwe oplossing. Twee dagen later werd dit nog eens herhaald en de afgegoten vloeistof bij de vorige fractie gevoegd, evenals nog twee dagen later de derde fractie. Uit vorige proeven was gebleken, dat de extractie niet langer behoeft te worden voortgezet, omdat de later verkregen infusen slechts weinig enzym bevatten. De totale hoeveelheid ferment, die uit de drie maagdeelten was verkregen, werd, na activeering bij den juiste zuurheidsgraad, bepaald, en dit leidde tot de volgende uitkomsten:

Tabel III.

		Aantal.	Gewicht.	Hoeveelheid enzym per gram. 1)	Totale hoeveelheid enzym.	Totale hoeveelheid enzym in pct. uitgedrukt.
Buiten- landsche maag A.	plooiën pylorus rest	18	3,460 G.	460	1592	22,9
			7,230 "	74	534	7,7
			24,180 "	199	4321	69,4
			34,870 G.		6947	100,0
Buiten- landsche maag B.	plooiën pylorus rest	14	1,840 G.	483	888	15,6
			8,550 "	28	240	4,2
			23,160 "	197	4557	80,2
			38,550 G.		5685	100,0
Buiten- landsche maag C.	plooiën pylorus rest	14	2,710 G.	494	1340	14,2
			9,250 "	54	503	5,3
			27,700 "	275	7605	80,5
			39,660 G.		9448	100,0
Binnen- landsche maag A.	plooiën pylorus rest	14	2,140 G.	823	1761	15,7
			3,750 "	36	136	1,2
			16,600 "	560	9289	83,1
			22,490 G.		11186	100,0
Binnen- landsche maag B.	plooiën pylorus rest	11	1,250 G.	340	425	8,4
			4,350 "	73	317	6,3
			16,520 "	260	4291	85,3
			22,120 G.		5033	100,0
Binnen- landsche maag C.	plooiën pylorus rest	13	2,100 G.	420	881	11,1
			7,500 "	39	290	3,6
			20,500 "	331	6780	85,3
			30,100 G.		7951	100,0

2) Zie noot op blz. 80.

In de tabellen is o.a. aangegeven, hoeveel enzym door één gram van elk maaggedeelte werd geleverd. Zooals werd verwacht, kon uit de plooien de grootste hoeveelheid enzym worden getrokken, veel minder uit de „rest” (ruim $\frac{1}{2}$) en uit het pylorusgedeelte c.a. een tiende gedeelte van dat uit de plooien.

De hoeveelheid stremsel, die *per maag* werd verkregen, was uiterst verschillend; ook wanneer deze magen van éénzelfde partij afkomstig waren ¹⁾. Een belangrijke fractie (19 pct.) vormde de hoeveelheid enzym uit de plooien. Van overwegenden invloed was echter de laatste niet, zoodat men in het aantal of het gewicht der plooien niet een maatstaf heeft te zien voor de waarde der lebmagen. Uit dit onderzoek volgt dus, dat er andere factoren moeten zijn, die véél meer invloed hebben.

Enkele dezer factoren kunnen wel worden aangegeven. In de eerste plaats zijn er natuurlijk individueele verschillen.

Verder is het het tijdstip, waarop de kalveren worden geslacht. Het is n.l. bekend, dat klierzellen in het algemeen vooral dan veel proferment (zymogeen) bevatten, wanneer ze gedurende enkele uren geen enzym hebben afgescheiden. Men mag dan ook verwachten, dat de kalvermaag dan veel ferment bevat, wanneer de laatste voeding minstens een zeker aantal uren geleden heeft plaats gehad. Intusschen hebben ervaring en onderzoek geleerd, dat ook de lebmaag van volkomen nuchtere dieren groote hoeveelheden lebferment bevat; misschien zelfs meer dan die der niet nuchtere kalveren. Bij de eerste zal de tijd na de geboorte waarschijnlijk van veel invloed zijn.

Bovendien is het natuurlijk van zeer veel belang, de magen zoo snel mogelijk te drogen bij een niet te hooge temperatuur.

In tijden van stremselschaarschte zou het zeker van belang zijn, deze punten nader onder de oogen te zien.

Nog enkele woorden moeten worden gezegd over het enzymgehalte van het pylorusgedeelte. De hoeveelheid ferment, hieruit verkregen was wél klein, maar toch slechts enkele malen zoo klein, dat ze verwaarloosd kon worden. Van de totale hoeveelheid stremsel per maag leverde het pylorusgedeelte respectievelijk:

A buitenlandsche magen:	5,0 pct.,	9,7 pct.,	7,7 pct.,	4,2 pct.,
	5,3 pct.			
B binnenlandsche magen:	6,1 pct.,	2,0 pct.,	1,2 pct.,	6,3 pct.,
	3,6 pct.			

In vele gevallen dus een belangrijk percentage. Het gemiddelde bedraagt 5,1 pct. *Het is dus niet wenschelijk dit maaggedeelte vóór de extractie* weg te werpen. Een tweede reden, waarom

¹⁾ De getallen van de laatste tabel zijn aanmerkelijk hooger dan die van de voorgaande; o. i. zijn de verschillen veel te groot om het gevolg van een verschillende techniek te kunnen zijn.

wordt aangeraden bij het behandelen der lebmagen het pylorus-gedeelte te verwijderen, is de sterke slijmvorming, waartoe vooral dit maaggedeelte zou bijdragen. Naar wij meenen, wordt dit gevaar erg overschat, want de pylorusextracten waren steeds gemakkelijk filtreerbaar; veel gemakkelijker dan die van plooien of van „rest“.

Das Lokalisieren des Lab-enzym in getrockneten Labmägen.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Es wurde bei einer Anzahl Kalbermägen die Labmenge, die aus dem Pylorusteile, den Falten und dem restierenden Teile zu erhalten war, bestimmt. Zu diesem Zwecke wurden die Magenteile zerschnitten, extrahiert und in den meisten Fällen mit Hilfe einer etwas abgeänderten Elektrode von BARENDRECHT auf einen bestimmten Säuregrad ($P_H = 5,2 - 4,9$) gebracht. Es wurden die Proben sodann bei einer Temperatur von 35° gestellt, bei welcher der Aktivierungsprozess stattfand.

In den verschiedenen untersuchten Mägen war die totale Enzymmenge eine wechselnde.

Es bildete die ganze Labmenge aus den Falten einen erheblichen Anteil der gesamten Labquantität (im Mittel 19 pct.). Nichtsdestoweniger darf weder die Zahl noch das Gewicht der Falten als Massstab für die Labmenge, welche aus einem Magen erhalten werden kann, betrachtet werden. Es müssen andere, in dem Texte genannte Faktoren von Einfluss sein. In Zeiten, wenn Labmägen rar sind, wäre mit diesen Einflüssen zu rechnen.

Es zeigte sich, dass der Pylorusteil einen nicht zu vernachlässigenden Teil der Labmenge lieferte; im Mittel 5,1 pct. Dementsprechend wäre es nicht angemessen, den Pylorusteil bevor der Extraktion zu entfernen, weil er zu enzymarm sein sollte. Auch das Filtrieren des Pylorusextraktes gab keinerlei Beschwerde im Vergleich mit den Extrakten anderer Mägenteilen.
