



Onderzoekingen over de vorming van diastase door *Aspergillus niger* van Tiegh

<https://hdl.handle.net/1874/276949>

A 192 *Thys 11 April 1922*

Onderzoekingen over de Vorming van Diastase door Aspergillus Niger van Tiegh.

DOOR

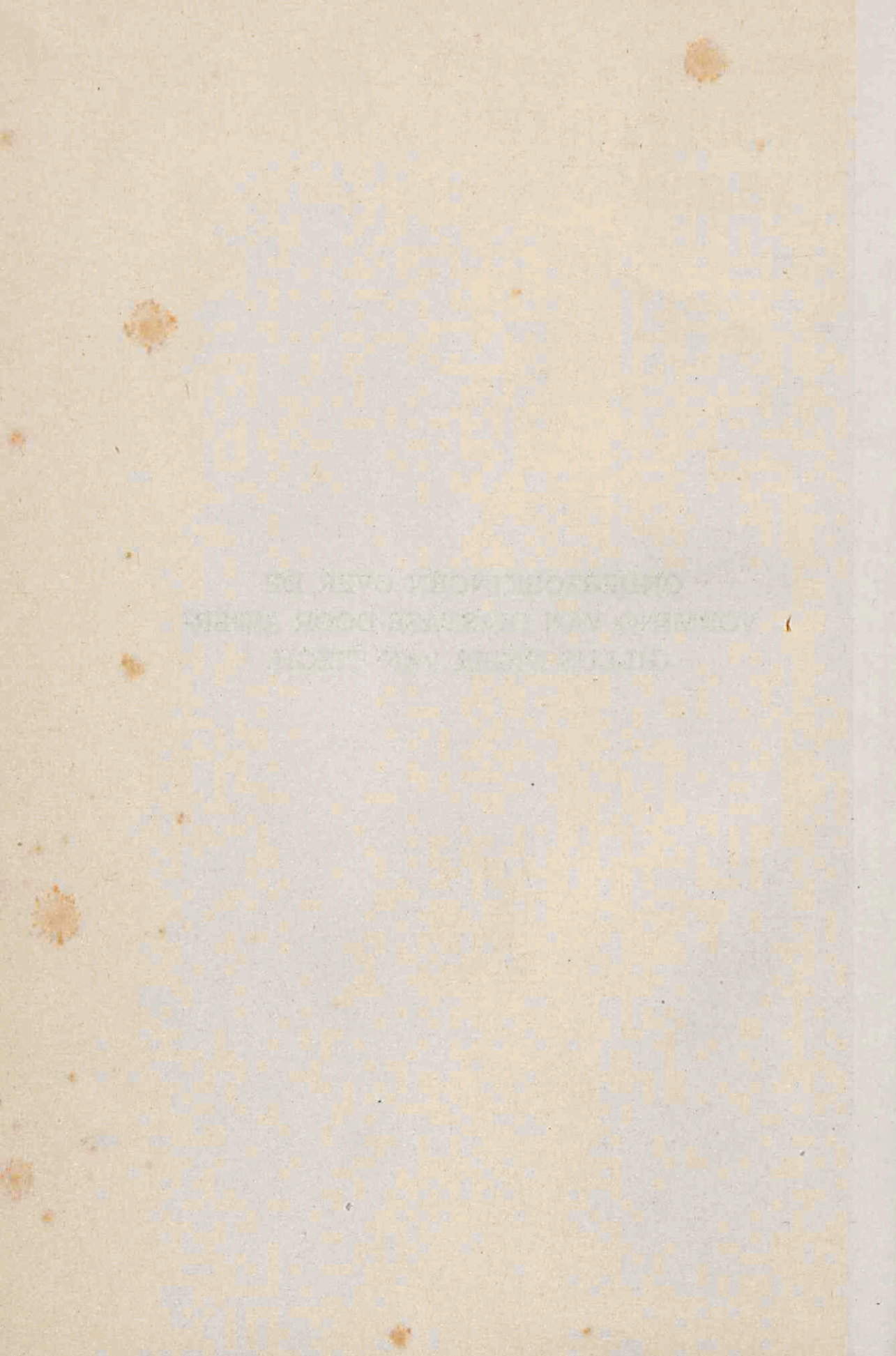
G. L. FUNKE



's-GRAVENHAGE
MARTINUS NIJHOFF
1922

ht
2

ONDERZOEKINGEN OVER DE
VORMING VAN DIASTASE DOOR ASPER-
GILLUS NIGER VAN TIEGH.



500

Diss. Utrecht 1922

ONDERZOEKINGEN OVER DE VORMING VAN DIASTASE DOOR ASPERGILLUS NIGER VAN TIEGH.

PROEFSCHRIFT TOT HET VERKRIJGEN VAN DEN GRAAD
VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE
RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN
RECTOR MAGNIFICUS DR. J. A. C. VAN LEEUWEN, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG,
DEN ELFDEN APRIL 1922, DES NAMIDDAGS TE 4 URE

DOOR

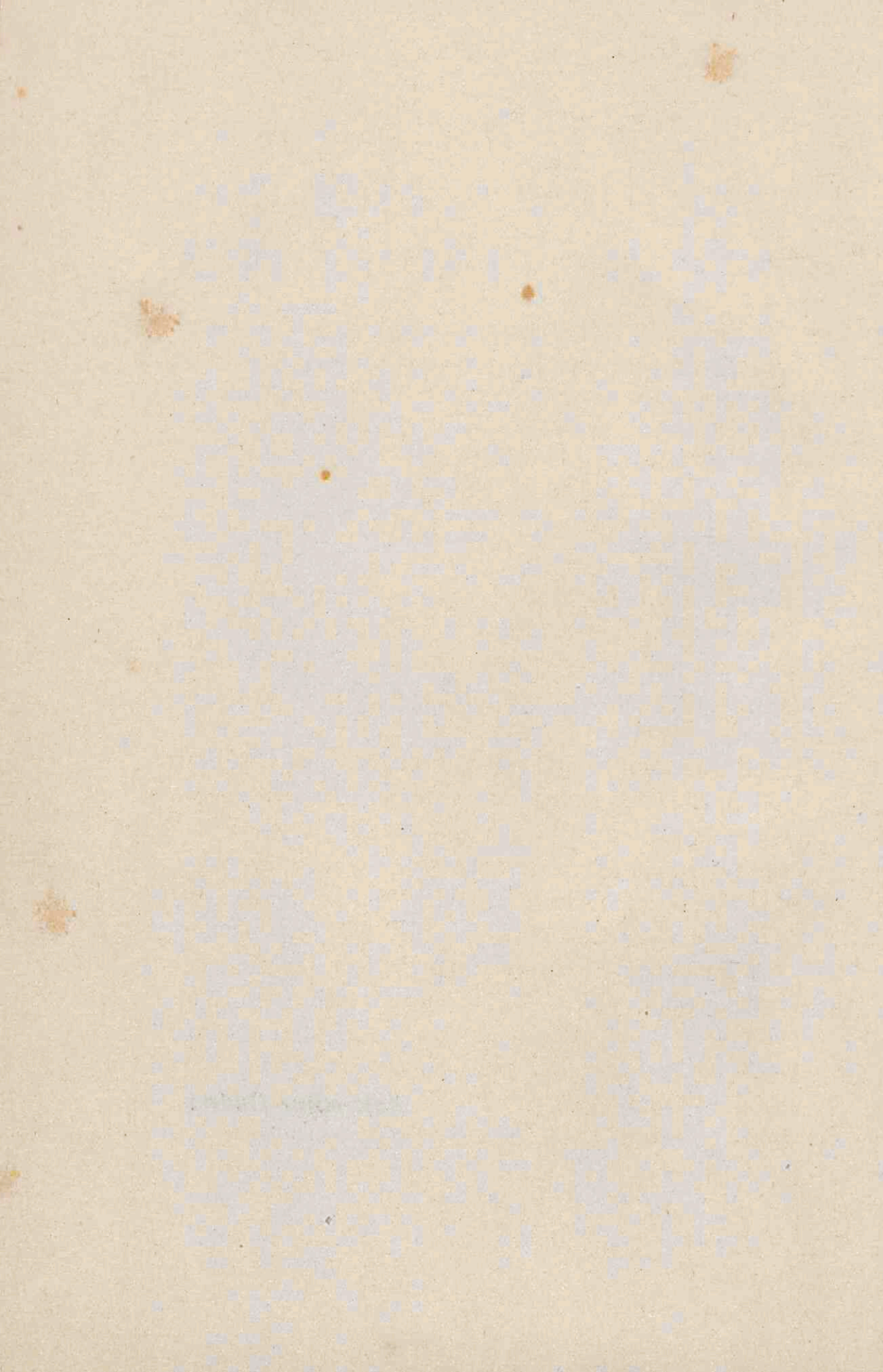
GEORGE LODEWIJK FUNKE

GEBOREN TE DEN HAAG



's-GRAVENHAGE
MARTINUS NIJHOFF
1922

Aan mijne Ouders



Het stemt tot dankbaarheid eenige jaren te hebben mogen leven in een omgeving waar men dagelijks omgang heeft met menschen die wetenschap maken en doceeren. Met vreugde grijp ik de gelegenheid aan eenige woorden te richten tot hen, die mij de waarde van deze omgeving hebben leeren kennen en appreciëeren en mij naar hun beste krachten bij mijn studie hielpen.

Meer nog dan het college dat ik bij U liep, zullen uw redevoeringen, Hooggeleerde *Cohen*, die ik bij verschillende gelegenheden mocht hooren, mij bij blijven als schoone uitingen van wetenschappelijk leven in den meest verheven zin.

Het doet mij leed, Hooggeleerde *Wichmann*, U niet meer in Utrecht te zien op den dag mijner promotie. Ik beschouw het als een voorrecht uw hooggewaardeerde persoonlijkheid te hebben leeren kennen op uw colleges en vooral ook van naderbij op de excursie, die ik met U mocht maken.

De bijzonder welwillende wijze waarop Gij, Hooggeleerde *Jordan*, steeds klaar stond om mij te woord te staan over verschillende kwesties die mij moeilijkheden brachten, is door mij altijd ten zeerste op prijs gesteld.

Hooggeleerde *Pulle*, wanneer ik U noem, denk ik natuurlijk in de eerste plaats aan de prachtige en

interessante plantengeographische excursie in het Ober-Engadin, die ik aan uw initiatief te danken heb. Maar ook de systematiek der planten is mij, onder uw leiding duidelijk en daardoor sympathiek geworden.

Hooggeleerde *Westerdijk*, ik zal er altijd dankbaar voor blijven dat mijn studie mij met U in aanraking heeft gebracht. Uw voorbeeld dat metterdaad toont hoe men goed en serieus werken kan doen samengaan met een alleszins blijde levensopvatting, is voor mij van groote waarde geweest en zal dat nog lang zijn.

De echt wetenschappelijke wijze waarop Gij, Hooggeleerde *Nierstrasz*, in uw colleges den nadruk weet te leggen op de groote lijnen, het essentiële in moeilijke en verwarde zaken met een enkel woord weet te karakteriseeren en daardoor bij uw hoorders voor altijd vast te leggen, is even origineel als voortreffelijk. De indruk daarvan zal voor mij blijvend zijn. De maanden gedurende welke ik op uw laboratorium onder uw persoonlijke leiding mocht werken, behooren daardoor tot de mooiste die ik aan de academie doorbracht.

Hooggeleerde *Went*, Hooggeachte Promotor, het is moeilijk in enkele woorden te zeggen wat gij in mijn studiejaren voor mij zijt geweest. Uw voortdurende belangstelling in mijn werk, uw zeer persoonlijke leiding daarbij, de groote welwillendheid waarmee gij altijd klaar stond mij te helpen, voor dat alles betuig ik U mijn hartelijke dankbaarheid. Met zeer veel genoegen zal ik ook steeds blijven herdenken de vele excursies, de groote gastvrijheid van uw huis en vooral de vriendelijke belangstelling, die mevrouw *Went* mij daarbij steeds betoonde.

INHOUD.

	Blz.
I. INLEIDING	1
II. OVERZICHT VAN DE LITERATUUR	2
III. METHODE VAN ONDERZOEK EN FOUTENBRONNEN	7
A. METHODE VAN ONDERZOEK	7
B. FOUTENBRONNEN	12
IV. RESULTATEN EN CONCLUSIES, VOOR DE SERIES GEKWEEKT OP GLUCOSE, ZETMEEL EN MALTOSE	22
A. RESULTATEN	22
B. CONCLUSIES	39
V. SERIES OP SACCHAROSE, GLYCERINE EN MELK- SUIKER	51
VI. SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN	57
VII. LITERATUUR	59
VIII. TABELLEN	63

I. INLEIDING.

Het was mijn plan te promoveeren op een onderzoek over enzymen. Toen ik aan het zoeken was naar een geschikt onderwerp, stelde prof. dr. *F. A. F. C. Went* mij voor, het werk dat hij begonnen was, voort te zetten. Dit was een onderzoek over den loop van de vorming van diastase door *Aspergillus niger*. Ik heb dit aanbod dadelijk en met vreugde aangevat. Voor ik begin met het beschrijven van mijn proeven en resultaten, wil ik aan prof. dr. *F. A. F. C. Went* mijn groote dankbaarheid uitspreken voor de bijzondere welwillendheid waarmee hij het voortzetten van eigen werk aan mij heeft overgelaten. Tevens voor de vele en waardevolle hulp, mij daarbij betoond en de groote vrijheid waarmee ik gebruik mocht maken van alle inrichtingen en materiaal, die het Botanisch Laboratorium te Utrecht bezit.

II. OVERZICHT VAN DE LITERATUUR.

Reeds vele onderzoekers hebben zich bezig gehouden met het vraagstuk of schimmels en bacteriën, onder invloed van de voeding, de afscheiding van hun enzymen kwalitatief en (of) kwantitatief reguleeren. De wijze echter waarop de meesten van hen hun proeven inrichtten, is zeer primitief; er wordt niet genoeg aandacht besteed aan storende invloeden; het probleem wordt door bijna een ieder van verschillende kanten aangepakt. Het verbaast ons dan ook niet te zien dat de verkregen resultaten elkaar vrij algemeen tegenspreken.

De eersten reeds die op dit terrein onderzoek verrichtten, zijn het er niet over eens, of de organismen hun enzymen slechts dan vormen wanneer ze noodig zijn, kwalitatief reguleeren dus. Zoo constateerde *Wortmann* (55) in 1882 dat bacteriën slechts dan diastase vormen, wanneer ze op zetmeel werden gekweekt. Hij werkte met een mengsel van rottingsbacteriën, zou dus zelf zijn materiaal niet kunnen noemen.

Büsgen (18) deelt echter in 1885 mede dat *Aspergillus Oryzae* ook diastase produceert wanneer hij die op glucose als eenige koolstofbron kweekte.

Fermi (27) 1890—1891, maakte culturen van bacteriën op resp. eiwitten en suikers; slechts in het eerste geval werden proteolytische enzymen gevormd. In 1895 echter vindt hij met *Montesano* (28) dat Asper-

gillus niger invertase afscheidt, wanneer als organisch voedsel uitsluitend glycerine wordt gegeven. Daarentegen geeft *Pfeffer* (42) in hetzelfde jaar als zijn meening te kennen, dat als regel organismen hun enzymproductie richten naar de aanwezige voeding. *Aspergillus niger*, gekweekt op een mengsel van glucose en zetmeel, zal eerst dan diastase produceeren, wanneer de glucose is opgebruikt, de schimmel dus aangewezen is op het zetmeel.

In het laboratorium van *Pfeffer* en in denzelfden geest deed in 1898 *Katz* (33) een meer uitvoerig onderzoek, waarbij hij schimmels kweekte (*Aspergillus niger* en *Penicillium glaucum*) op verschillende suikers, steeds echter met toevoeging van zetmeel, meestal 0,25 %. Hij nam waar dat de suikers de productie van diastase zeer verminderen en wel te meer naarmate hun concentratie hooger is; bij *Penicillium* wordt de diastasevorming zelfs bij lage suikerconcentratie al geheel stopgezet. Toch vond hij ook diastaseproductie op glucose alleen. Hier werd dus voor het eerst een quantitative regulatie onder invloed van de voeding waargenomen. Jammer is het dat *Katz* zich vergenoegde met van dag tot dag te onderzoeken of er van het zetmeel in de cultuurvloei-stof nog iets over was; viel de jodiumreactie negatief uit, dan werd de proef niet verder voortgezet. Bij de cultuur op glucose was hem één waarneming ook voldoende om zijn conclusies uit te trekken.

Duclaux (23) zegt in 1899 reeds, dat *Penicillium glaucum* en *Aspergillus niger* vele enzymen produceeren, die slechts binnen vrij wijde grenzen afhankelijk zijn van

de voeding. Tot een dergelijk resultaat kwam ook *Went* (51) in 1901. Hij vond bij *Monilia sitophila* tien verschillende enzymen, die hij in drie groepen verdeelde naar gelang hun afscheiding door de voeding werd gereguleerd: een groote groep was steeds aanwezig, onverschillig welke voedingsbodem gegeven werd; een tweede die niet altijd, maar dan toch bij verschillende stoffen werd gevormd en een groep die slechts optrad, wanneer die stoffen aan de schimmel werden gegeven, die door de enzymen in kwestie worden gesplitst.

Ook *Butkewitsch* (19) merkte in 1902 bij *Aspergillus niger* en *Penicillium glaucum* op, dat de voeding invloed heeft op de hoeveelheid enzym die geproduceerd wordt. Waar hij maar met twee verschillende samenstellingen van voedingsbodems experimenteerde, mogen uit zijn resultaten niet te veel gevolgtrekkingen gemaakt worden.

Pottevin (43) deed in 1902 een onderzoek naar de lactase van *Aspergillus niger*; deze bleek slechts onder bijzondere omstandigheden op te treden en dat nog wel wanneer ze haar specifieke werkzaamheid uit kon oefenen.

Dox (22) 1910 meent, na een onderzoek op *Penicillium camemberti*, dat alle enzymen die een organisme kan produceeren, ten allen tijde aanwezig zijn; dat de voeding dus slechts een quantitatieven invloed heeft en wel in dien zin, dat er meer enzym gevormd wordt naarmate het meer noodig is. Ongeveer dezelfde meening verkondigen *Colin* (21) 1911 en *Grézes* (32) 1912.

In 1911 voerde *Kylin* (34) een onderzoek uit dat wel

breeder werd opgezet dan de vorige, maar dat in deze zaak toch ook niet veel meer klaarheid brengt. Hij cultiveerde schimmels op verschillende stoffen, steeds met bijvoeging van zetmeel en ging van dag tot dag na of er nog zetmeel in de voedingsbodem aanwezig is. Hoe meer suiker is toegevoegd, hoe langer het duurt eer dit verdwijnt. Wanneer dit echter het geval is, dan achtte hij de proef geëindigd. Ook op voedingsbodems zonder zetmeel constateerde hij diastaseproductie. Hij ging dit na voor zeer vele verschillende stoffen. Bij alle kwam diastase voor; wanneer echter zetmeel was toegevoegd, was de diastaseproductie veel belangrijker en nog sterker was dit het geval wanneer alleen zetmeel als voeding gegeven werd. *Kylin* ziet hierin een mooi voorbeeld van quantitatieve regulatie.

Al deze onderzoeken hebben een groote fout gemeen: er werd nooit gelet op den leeftijd van de schimmels wanneer men de waarnemingen deed. Toch is het moeilijk aan te nemen dat een schimmel ten allen tijde van haar ontwikkeling een zelfde hoeveelheid enzym afscheidt; het is integendeel zeer goed denkbaar, dat een zekere hoeveelheid wordt gevormd, die later door een of andere oorzaak weer verdwijnt. In geen geval is men gerechtigd de resultaten die men verkrijgt bij twee proeven, op verschillenden leeftijd van het organisme genomen, met elkaar te vergelijken. Deze overwegingen brachten *Went* (52) ertoe in 1914 na te gaan hoe het verloop van de diastasevorming is bij een schimmel i.c. *Aspergillus niger*, gedurende de heele ontwikkeling. Als voedingsbodem werd gebruikt 5 % glucose en elken dag, later om de twee of drie dagen

werd onderzocht of en hoeveel diastase aanwezig was in mycelium en cultuurvloeistof. Op deze wijze werd een voorstelling verkregen van de enzymproductie en van den leeftijd van de schimmel, waarop die productie haar maximum bereikt.

Wanneer men nu hetzelfde doet met culturen op voedingsbodems van andere samenstelling, krijgt men een materiaal van feiten dat recht geeft tot het maken van gevolgtrekkingen van eenige waarde. Dit nu is het doel van het aanhangig onderzoek.

Ik heb hier slechts de literatuur genoemd die in engeren zin op het onderwerp betrekking heeft. Bij het bespreken van verschillende onderdeelen zal ik steeds verwijzen naar de daarbij behorende artikelen.

III. METHODE VAN ONDERZOEK EN FOUTENBRONNEN.

A. METHODE VAN ONDERZOEK.

De methode van dit onderzoek is door *Went* (52) reeds uitvoerig beschreven. Waar ik daarvan slechts weinig ben afgeweken, kan ik met een korte beschrijving volstaan.

Als voedingsbodem werd gebruikt een oplossing van de volgende zouten:

NH_4NO_3	0,5 %
K_2HPO_4	0,1 %
MgSO_4	0,05 %

Hieraan werd nooit iets veranderd. Als organische voeding werden meest koolhydraten gegeven; hun aard en concentratie zal bij de bespreking van de proeven worden medegedeeld. Van deze cultuurvloei-stof werd telkens 75 c.c.M. in elke kolf gedaan; 40 à 50 kolven vormden een serie die, na gesteriliseerd te zijn, tegelijkertijd werden geënt. Dit enten geschiedde als volgt: een flinke hoeveelheid conidiën werd gebracht in een buisje met gesteriliseerd water. Zij verspreiden zich daarin over het oppervlak. Met een entoog werd nu van dat oppervlak telkens een druppel genomen en in een kolf gebracht. Men mag aannemen dat zodoende ongeveer evenveel conidiën in elke kolf terecht komen.

De ontwikkeling was dan ook altijd zeer gelijkmatig in alle kolven; hoogstens was in de eerste dagen eenig verschil merkbaar.

De culturen werden gebracht in een kamer, waar de temperatuur 22° bedroeg (later 20°). Electriche kachels, die automaties werden gereguleerd, zorgden ervoor, dat deze temperatuur bewaard en tevens constant bleef. Schommelingen waren uiterst zeldzaam en nooit hoger dan 0.2° . Door ervoor te zorgen, dat er steeds water stond in eenige platte zinken bakken, was de vochtigheidsgraad er eveneens constant. De kamer had geen ramen, zoodat de culturen er in het donker stonden, behalve gedurende den tijd waarin de waarnemingen plaats hadden. Ik heb nooit eenigen invloed kunnen bemerken van het electriche licht dat dan moest branden. Gasleiding was niet aanwezig.

Twee à drie dagen na het enten was de ontwikkeling meestal zoover gevorderd, dat ik kon beginnen met waarnemen. Per dag werden daartoe twee of drie culturen gebruikt en wel in de eerste week elken dag, in de tweede week om den anderen dag, in de weken daarop om de drie of vier dagen. Met die culturen werd als volgt te werk gegaan: van beide kolven werd de cultuurvloeistof afgefiltreerd. Het mycelium van een daarvan werd daarbij opgevangen op een tevoren in den exsiccator gedroogd en dan gewogen filter. Wanneer dit filter met het mycelium wederom in den exsiccator tot constant gewicht gebracht was, werd het nogmaals gewogen. Zodoende kan men de ontwikkeling van de schimmel nauwkeurig volgen. Het andere mycelium werd eerst goed afgewasschen om

alle cultuurvloeistof, die diastase kon bevatten, eraf te spoelen, dan fijngewreven met infusoriënaarde, vervolgens uitgetrokken met de cultuurvloeistof, die tevoren was opgekookt ter vernietiging van mogelijk enzym; soms ook werd uitgetrokken met 75 c.c.M. water. Na een uur werd het mengsel gefiltreerd en het filtraat onderzocht op diastase, evenals de cultuurvloeistof uit de andere kolf; dikwijls werd één cultuur meer gebruikt om uit eenige getallen een gemiddelde te kunnen bepalen.

Het onderzoek naar het gehalte aan diastase nu had op de volgende wijze plaats. Ik maakte een oplossing van aardappelzetmeel, dat geprepareerd was volgens de methode van *Lintner*. Hiervan werd telkens 1 Gr. opgelost in 1250 c.c.M. water (een oplossing dus van 0,08 %) onder voortdurend roeren, terwijl ervoor gezorgd werd dat het water niet tot koken kwam. Van deze oplossing werd een hoeveelheid, meestal 25 c.c.M., vermengd met een zelfde hoeveelheid van de te onderzoeken vloeistof; het tijdstip van het vermengen werd genoteerd; van tijd tot tijd werd een weinig ervan afgenomen, telkens na even schudden. Met een verdunde oplossing van J in JK werd dan gezien of nog zetmeel of erythrodextrine aanwezig was. Zoodra er geen zelfs zwakroode kleuring meer optrad, doch de vloeistof geel bleef, werd het zetmeel geacht te zijn omgezet. De tijd, die hiervoor noodig was, is natuurlijk zelden heel precies te bepalen maar men benadert dien toch zeer goed door te interpoleeren tusschen de twee laatste waarnemingstijden waarbij resp. een zwak geelroode en gele kleur optrad. Natuurlijk werd ervoor gezorgd dat die

laatste waarnemingstijden zoo kort mogelijk na elkaar komen. Bij de meeste omzettingen kon de tijd worden uitgedrukt in minuten, bij de allerkortste in seconden.

Went verdeelde het mengsel van zetmeel en cultuurvloeistof of myceliumextract over vele reageerbuisjes. Het is me echter gebleken dat de verdeling van het enzym in de vloeistof niet altijd geheel homogeen is. Het gebeurt n.l. dat soms de omzetting in sommige buisjes sneller verloopt dan in andere. Daarom is het ook goed om het mengsel telkens even te schudden voor men een proef er af neemt. Het afpipetteeren in de vele buisjes neemt daarbij onnoodig veel tijd in beslag.

Uit de omzettingstijden berekende ik een waarde voor het enzymgehalte op dezelfde wijze als *Went*: voor een omzettingstijd van 150 minuten nam ik aan een hoeveelheid enzym = 100. Bedraagt de omzettingstijd dus b.v. 54 minuten, dan wordt de hoeveelheid enzym $\frac{150}{54} \times 100 = 277,8$.

Behalve het drooggewicht en het enzymgehalte werd tevens elken dag bepaald de zuurgraad van de cultuurvloeistof zoowel als van het myceliumextract en soms ook de hoeveelheid suiker, die nog over was in de voedingsbodem.

Wat niet gebruikt werd van de verschillende vloeistoffen bleef bewaard en daarmee werd in de volgende dagen op dezelfde wijze nagegaan hoelang het enzym zijn kracht behield. Hierover zal nader worden bericht.

Volledigheidshalve vermeld ik dat bij alle omzettingen de invloed van vreemde organismen werd geweerd door toevoeging van eenige druppels toluol.

Als bezwaar tegen deze methode zou men m.i. in de eerste plaats kunnen aanvoeren de weinige nauwkeurigheid die men bereikt door het nagaan van de zetmeelomzetting met de jodiumreactie. Natuurlijk is het bepalen van rotatie en reductievermogen veel nauwkeuriger; de lage concentratie van het zetmeel maakt deze bepalingen echter heel moeilijk; daarbij had ik voor mijn proeven dien hoogen graad van nauwkeurigheid niet noodig. De getallen die ik verkreeg, dienen slechts om vergeleken te worden met andere en staan ieder op zichzelf in een lange reeks, die tezamen het verloop aangeven van de enzymvorming. Zooals men later zal zien, is het mij vrijwel gelukt een voorstelling van dat verloop te krijgen, ook ondanks het feit dat deze niet het resultaat is van waarnemingen, gedaan aan één cultuur. Want dat is eveneens een groot bezwaar, dat men met zeer vele schimmelculturen moet werken, waarbij de individueele verschillen niet te vermijden zijn. Intusschen geloof ik wel te mogen verklaren, dat ook dit bezwaar niet groot genoeg is om ons te beletten na te gaan, wat er tijdens de ontwikkeling plaats heeft.

Het groote voordeel van de methode is, dat ze weinig tijd kost. Slechts daardoor is het mij mogelijk geweest mijn waarnemingen uit te strekken over bijna duizend culturen. Het behoeft geen nader betoog, dat het groote feitenmateriaal, op deze wijze verkregen, opweegt tegen vele bezwaren. Het is meer waard van een gebeurtenis bij herhaalde waarneming telkens hetzelfde algemeene beeld te verkrijgen, dan slechts éénmaal, zij het in dat geval dan ook met iets meer nauwkeurigheid.

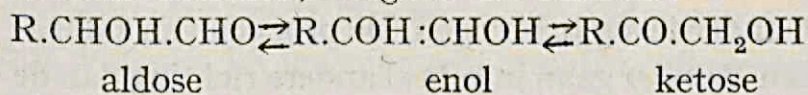
B. FOUTENBRONNEN.

De foutenbronnen, die een onderzoek als dit bemoeilijken, zijn ongemeen talrijk. Geheel en al te ontgaan zijn ze niet en ik geloof dat men nooit anders uit deze zaak zal krijgen dan waarden, die slechts bij benadering en relatief juist zijn. Men moet wel in het oog houden dat ik het woord foutenbron hier zeer ruim opvat. Ik versta er tevens onder de moeilijkheden die uit de variabiliteit van het proeforganisme zelve voortvloeien, een variabiliteit, zoo groot, in zoo sterke mate onderhevig aan invloeden die men geneigd is te verwaarloozen, dat totnogtoe, voor zoover mij bekend, nog niet twee onderzoekingen over *Aspergillus* zijn gedaan, die volkomen met elkaar zijn te vergelijken.

Sinds het werk van *Hanna Lappalainen* (35) weten we dat niet alleen de chemische samenstelling van het glaswerk van grooten invloed is op habitus, conidiënvorming en physiologische eigenschappen, maar dat hetzelfde soort glas in deze opzichten nog belangrijke verschillen kan vertoonen naarmate het nieuw is of reeds gedurende eenigen tijd gebruikt. Ik werkte met bolvormige kolven met rechten hals; toen daar eenige malen schimmels in waren gekweekt, werden ze dus vervangen door nieuwe van hetzelfde soort. Dit glas splitste alkaliën af, wanneer daarin een vloeistof werd gekookt, eveneens bij het steriliseeren van de cultuurvloeistof. Nadat 75 c.c.M. water een kwartier in zoo'n kolf had gekookt, gaf phenolphthaleïne een sterke roodkleuring. Een enkele druppel zuur van 0.1N was voldoende om het water weer te neutraliseeren. Om na te

gaan of reeds eenige malen gebruikte kolven en nieuwe ook hierin verschilden, titreerde ik het daarin gekookte water met een zeer zwak zuur, ong. 0.005 N. Ik kreeg hierbij de volgende uitkomsten: 50 c.c.M. water, in nieuwe kolven gekookt, werden geneutraliseerd door resp. 10.9, 34.1 en 12.7 c.c.M. zuur; dito in oude door resp. 33.3 en 23.1 c.c.M. Men ziet dat de kolven in dit opzicht groot verschil vertoonen hoewel men hieruit nog niet mag afleiden, dat reeds gebruikte kolven altijd meer alkaliën afsplitsen.

Het steriliseeren geschiedde door de kolven op drie achtereenvolgende dagen gedurende een half uur op 100° te verhitten. De eerst witte oplossingen van reduceerende suikers, maltose, glucose, melksuiker, werden daarbij vrij sterk bruin gekleurd. M.i. moet men dit toeschrijven aan de werking van de alkaliën; er heeft hoogstwaarschijnlijk een enolisatie plaats, waarbij ook ketosen ontstaan, volgens dit schema:



(Boëseken (16)).

Er moet dus rekening mee gehouden worden dat in de series op reduceerende suikers gekweekt, die suikers steeds voor een klein deel in andere vormen waren omgezet.

De hoeveelheid zuur, die *Aspergillus niger* vormt, is echter vanaf den eersten dag van ontwikkeling reeds aanzienlijk genoeg om de alkaliën te neutraliseeren; ik heb er daarom geen verdere aandacht aan geschonken. Natuurlijk was het beter geweest Jenaglas te gebruiken, maar daarvan was niet voldoende voorraad be-

schikbaar. Immers, 200 à 300 kolven waren bijna steeds tegelijkertijd in gebruik.

Hanna Lappalainen deelt ook mede dat in het laboratorium van professor *Elfvig* te Helsingfors, culturen van *Aspergillus niger* aanwezig zijn, die men van verschillende kanten had laten komen. Hieronder bleken niet minder dan acht rassen te zijn die in physiologisch opzicht van elkaar verschilden. *Brenner* (17) vond daar nog drie nieuwe bij. Hij vergelijkt ze met de mutaties die *Schiemann* (46) beschreef, doch is daartoe m.i. niet gerechtigd. *Schiemann* verkreeg ze n.l. door toevoegen van vergiftige zouten aan de voedingsbodem, *Brenner* door te kweken bij verschillende temperaturen en wel steeds vele maanden achtereen. Dit heeft ongetwijfeld grooten invloed, maar wanneer men maar lang genoeg de oorspronkelijke omstandigheden laat inwerken, keeren ook de oorspronkelijke eigenschappen weer terug. Hemzelf is het tenslotte dan ook gelukt een ras weer tot een ander terug te brengen. De proeven van *Lappalainen* en *Brenner* gaan in geheel andere richting dan de mijne, de physiologische afwijkingen die zij bestudeerden en beschreven zijn andere, zoodat het mij niet mogelijk is geweest uit te maken met welk van hun rassen ik heb gewerkt. Ik kan slechts mededeelen dat ik een reïncultuur kreeg uit de verzameling van het Phytopathologisch Laboratorium „Willie Commelin Scholten” te Baarn, waarvan verder steeds werd overgeënt.

Een bijzondere oorzaak voor de vele rassen die *Brenner* verkreeg, ligt daarbij voor een groot deel in de temperatuur waarbij hij soms kweekte, nl. 35°. Daarbij treden allerlei complicaties op die ik bij 20° en 22° nooit

waarnam, zooals het voorkomen van zetmeel in de hyphen. *Boas* (13) heeft trouwens ook al gewaarschuwd tegen de vele bijzonderheden, die *Aspergillus niger* bij hogere temperaturen vertoont.

In dit verband zijn nog eenige feiten belangrijk. Het is me gebleken, dat het er ten zeerste op aankomt met welke conidiën men een serie ent: eenige series werden nl. dubbel genomen, een daarvan geënt met conidiën die afkomstig waren van een cultuur op dezelfde voeding als de serie in kwestie, de andere met conidiën van een daarvan verschillende voedingsbodem. Altijd traden tusschen twee van dergelijke series groote verschillen op: de diastaseproductie, drooggewicht, habitus, conidiënvorming, in dat alles uitte zich de afkomst van de conidiën. Vaste regels zijn in dezen voorloopig nog niet te geven. Hoewel ik er later op hoop terug te komen, wil ik nu reeds even wijzen op eenige treffende voorbeelden. Tabel IA en IB geven een overzicht van de diastasevorming bij twee series, ieder gekweekt op 5 % glucose. IA is geënt met conidiën afkomstig van een cultuur, eveneens op 5 % glucose (GG), de andere van een op 0,5 % zetmeel, (ZG). Verder zie men fig. 10 die een graphische voorstelling geeft van de ontwikkelde hoeveelheden enzym van twee series op zetmeel 0.5 %, resp. geënt van culturen op 0.5 % zetmeel (ZZ) en 5 % glucose (GZ).

In al deze gevallen kwamen de conidiën van flink ontwikkelde culturen, die nooit ouder waren dan drie à vier weken; de oorzaken voor deze verschijnselen kunnen dus niet liggen in het feit, dat de conidiën niet volkomen kiemkrachtig waren.

Totnogtoe heeft men slechts zelden gedacht aan de mogelijkheid van zulk een sterke nawerking van een vorig milieu en er bij proeven dan ook geen rekening mee gehouden. Het blijkt intusschen noodzakelijk te zijn dat te doen en niet te snel over te gaan tot het accepteren van nieuwe rassen.

De eenige auteur die, voor zoover mij bekend, iets dergelijks heeft waargenomen bij *Aspergillus niger*, is *Grezes* (32). Hij vond zeer verschillende hoeveelheden invertase wanneer de conidiën afkomstig waren van culturen op saccharose of barnsteen-zuur. De culturen waren tevoren reeds minstens zestig maal achtereenvolgens op voedingsbodems van diezelfde samenstelling overgeënt; men ziet uit mijn proeven, dat een dergelijke langdurige inwerking van het milieu volstrekt niet noodzakelijk is om markante verschillen te verkrijgen. Ik achtte twee maal achtereenvolgens enten op dezelfde bodem in dezen reeds voldoende. Het is zeer de moeite waard deze feiten te vergelijken met eenige waarnemingen van *mej. Joh. Westerdijk* en van *Luyk* (53) over een soortgelijk verschijnsel bij de sporen van *Gloeosporium*.

Het werd ondertusschen moeilijk bij deze onzekerheden een gedragslijn vast te stellen. Ik besloot alle series te enten met conidiën van culturen, die op voedingsbodems van gelijke samenstelling gegroeid waren. Bij de gevallen waarin daarvan werd afgeweken, zal dat vermeld worden. Voor eventueele latere onderzoekers op dit gebied is het dan de aangewezen weg om eenzelfde gedragslijn te volgen. Slechts dan zal het mogelijk zijn hun resultaten te vergelijken met de mijne.

Het opvallend groote verschil tusschen mijn eerste uitkomsten en die van *Went* deed bij mij het vermoeden rijzen of wellicht de oppervlakte der culturen eenigen invloed op hun physiologisch gedrag kon uitoefenen. *Went* werkte met een oppervlakte van 24 □c.M., later van 47 □c.M., mijn culturen hadden altijd een oppervlakte van 48 □c.M. Waarschijnlijk leek het dus wel niet, dat hierin de oorzaak kon liggen. Toch nam ik een proef, die weliswaar niet ophelderde wat de reden was van het genoemde verschil, maar die desniettemin niet zonder resultaat bleef. In Erlemeyerkolven van twee verschillende grootten en wel in zes van ieder, werd 75 c.c.M. voedingsoplossing gebracht van 1 % glucose. De oppervlakte van de vloeistof bedroeg in de kleine 26 □c.M., in de groote 82 □c.M. Op denzelfden dag werd geënt, den 8sten, 14den en 21sten dag waargenomen. De resultaten ziet men in de tabel:

26 c.M.

dagen	diast. in het myc.	P _H van het myc. ex- tract	diast. in de cultuur- vloeistof	P _H van de cultuur- vloeistof	droogge- wicht in m.Gr.
8	93.5	3.6	158	3.57	168
14	277.8	3.2	1200	3.1	282
21	187.5	3.5	2000	3.35	251
82 c.M.					
8	300	3.2	320	3.1	342
14	214	3.2	1500	3.1	296
21	100	3.4	1788	3.3	237

Men ziet hieruit, dat men tot na de eerste week rekening dient te houden met de oppervlakte. De hoeveel-

heid enzym, het drooggewicht zoowel als de zuurgraad blijven achter bij de culturen in de kleine kolven; later herstelt zich deze achterstand en is weinig verschil meer te merken.

De onderzoekingen in de laatste twaalf jaren gedaan over den invloed van de waterstofionenconcentratie op de werking van enzymen, noodzaakten mij na te gaan hoe de diastase van *Aspergillus niger* reageerde op den zuurgraad van het milieu. Dat die niet zonder invloed kon zijn, stond al dadelijk bij mij vast, daar *Aspergillus niger* veel zuur produceert, zoodat de diastase steeds werkt bij een hooge waterstofionenconcentratie.

Ik richtte mijn onderzoek in naar de methode van *Sørensen* (47). Deze berust hierop, dat men standaardoplossingen maakt, die een bekende waterstofionenconcentratie hebben. Deze, en de stof waarvan men die concentratie te weten wil komen, worden met een indicator gekleurd; door vergelijken van de kleuren kan men de waterstofionenconcentratie zeer nauwkeurig bepalen. De standaardoplossingen werden in dit geval gemaakt volgens de opgaven van *Clark* en *Lubs* (20). De chemicaliën, die ik hiervoor noodig had, werden mij in zuiveren toestand welwillend beschikbaar gesteld door *dr. I. M. Kolthoff*, terwijl *prof. dr. W. E. Ringer* zoo vriendelijk was de standaardoplossingen zelf voor mij te controleeren met de waterstofelectrode. Beiden heeren breng ik hier mijn hartelijken dank voor hun zeer gewaardeerde hulp, die het mij mogelijk maakte dit onderdeel van mijn proeven zonder al te groote moeite uit te voeren.

Het onderzoek zelf was vrij eenvoudig. Van een

enzymoplossing werd telkens een zekere hoeveelheid (10, 15 of 20 c.c.M.) vermengd met evenveel zetmeeloplossing die in deze gevallen 0.16 of 0.32 % sterk was. Om verschillende zuurgraden te verkrijgen, gebruikte ik de standaardoplossingen zelf. Deze werden in meest even groote hoeveelheden aan het enzym-zetmeel toegevoegd. Zij hebben daarbij het voordeel, dat zij bufferoplossingen zijn, zoodat de waterstofionenconcentratie tijdens de proeven constant bleef. De H' van het mengsel werd dan bepaald, evenals de omzettingstijden bij de verschillende zuurgraden. Voor verdere bijzonderheden mag ik verwijzen naar de artikelen van *Sørensen* en *Michaëlis* (37—40).

De resultaten vindt men in fig. 1 op de gebruikelijke

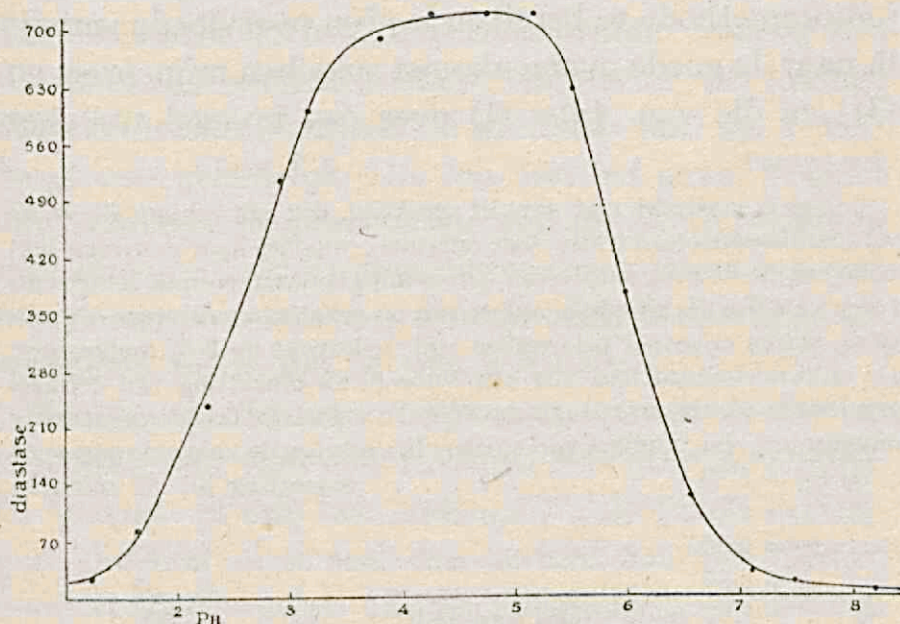


Fig. 1. Invloed van de H' op de werking van de diastase van *Aspergillus niger*.

wijze uitgedrukt. Deze kromme kwam uit alle proeven te voorschijn, onverschillig de concentratie van de

diastase, zoowel voor die in de cultuurvloeistof als in het mycelium.

Men ziet dat de diastase van *Aspergillus niger* vrij ongevoelig is voor den zuurgraad; binnen wijde grenzen is de werking optimaal. Het is een gelukkige coïncidentie, dat de schimmel deze optimale concentratie altijd zelf tot stand brengt in haar cultuurvloeistof. Men behoeft ze nu nooit kunstmatig daartoe te brengen ¹⁾. Soms is ze te hoog, doch men bedenke dat voor het waarnemen de vloeistof altijd vermengd wordt met de neutrale zetmeeloplossing. Daardoor zakt de P_H altijd tot binnen de grenzen van optimale werkzaamheid.

Dit werk vereischte natuurlijk groote nauwkeurigheid. Men kan aan de figuur wel zien dat die met de jodiummethode te bereiken is. Ten overvloede verwijs ik naar de goede overeenkomst tusschen mijn proeven (31) en die van *Adler* (1) over den invloed van het

¹⁾ Het is volstrekt niet vanzelf sprekend, dat een schimmel zelf die waterstofionenconcentratie doet ontstaan, waarbij haar enzymen hun volle kracht kunnen ontplooien. Dit is mij gebleken, toen ik eenige culturen van *Monilia sitophila* onderzocht op gehalte aan diastase. De culturen waren ongeveer drie weken oud; gekweekt op 5 % melksuiker. De cultuurvloeistof had hier een $P_H = 8$; de omzetting van zetmeel geschiedde daarbij zeer langzaam. Werd de vloeistof echter kunstmatig aangezuurd, dan ging het veel sneller. Ik verkreeg de volgende gegevens

bij $P_H = 3.95$	omzetting in	52 minuten
„ „ = 5.40	„ „	31 „
„ „ = 5.90	„ „	32 „
„ „ ± 6.50	„ „	32 „
„ „ ± 7.50 (natuurlijke toestand)	„ „	500 „

Dit is nog slechts een voorloepig resultaat; het zegt echter genoeg om tot groote voorzichtigheid aan te manen. Voordat men een onderzoek gaat doen naar quantitative enzymproductie, dient men dus eerst te weten bij welke waterstofionenconcentratie die enzymen moeten worden waargenomen.

milieu op de werking van de diastase van mout.

Over het algemeen behoefde ik dus geen rekening meer te houden met den zuurgraad, behalve in één geval. Zooals men uit de kromme ziet, is de werking bij $P_H = 6$ reeds minder dan optimaal, bij $P_H = 7$ bijna nihil. Nu bevat het mycelium zelf ongeveer geen zuur. Wanneer men het met water uittrekt heeft het extract een $P_H = \pm 6$; het vermengen met zetmeeloplossing doet dat nog dalen tot ± 6.5 , m.a.w. de diastase werkt dan maar met een deel van haar kracht; de cijfers die men zoo krijgt geven een te lage waarde aan. Om een mogelijken invloed van bijmengsels in de cultuurvloei-stof te ontgaan, had ik tot mijn spijt reeds een aantal waarnemingen op deze wijze gedaan, voordat mij bekend was welk een fout ik hiermee beging. Daarbij kan die invloed, zoo die al bestaat, van slechts zeer geringe beteekenis zijn. Immers, de kromme van fig. 1 verloopt zeer geleidelijk. Dit zou niet het geval geweest zijn, wanneer de bijmengsels van de cultuurvloei-stof hun eigen invloed hadden uitgeoefend. Want dan had men mogen verwachten, schommelingen of andere afwijkingen in de lijn te zien optreden.

Zooals men ziet, zijn er bij een onderzoek als dit vele moeilijkheden waar men rekening mee heeft te houden. In hoeverre ik erin ben geslaagd resultaten te verkrijgen, die niet al te zeer den invloed daarvan hebben ondervonden, moge uit de volgende hoofdstukken blijken.

IV. RESULTATEN EN CONCLUSIES, VOOR DE SERIES GEKWEKT OP GLUCOSE, ZET- MEEL EN MALTOSE.

A. RESULTATEN.

De resultaten die ik op de hierboven beschreven wijze verkreeg, heb ik voor elke serie in een tabel samengebracht. Voordat ik de hoofdzaken van ieder daarvan afzonderlijk bespreek, zou ik eerst eenige opmerkingen willen maken die voor vrijwel alle gelden. Als voorbeeld kies ik daarbij tabel N^o. 3, waarin de waarnemingen zijn neergelegd, gedaan aan een serie die gekweekt werd op 2.5 % glucose. Men ziet aan het hoofd boven de kolommen wat zij voorstellen.

Tusschen den 13den en 16den dag wordt het laatste voedsel verteerd, zooals blijkt uit de draaiing die de cultuurvloeistof geeft in den polarimeter (2de kolom). Iets vroeger is het maximum aan drooggewicht bereikt (9de kolom). Voordat dus nog de assimilatie geheel ten einde is, heeft de dissimilatie reeds de overhand verkregen. Dit gaat zoo bij de meeste series; soms ook vallen deze twee verschijnselen samen. Na het bereiken van dit maximum vermindert het gewicht van het mycelium, eerst vrij snel, later zeer langzaam; soms blijft zelfs een vrijwel constante hoeveelheid gedurende een lange reeks van dagen bewaard.

De zuurgraad van de cultuurvloeistof (8ste kolom) stijgt ook tot den 13den dag, neemt daarna iets af en blijft dan verder even hoog. Hetzelfde geldt, zooals trouwens vrijwel vanzelf spreekt, voor het extract uit het mycelium (6de kolom), wanneer dat met de opgekookte cultuurvloeistof is uitgetrokken. Zeer dikwijls stijgt de waterstofionenconcentratie boven die, welke optimaal is; ik heb reeds medegedeeld waarom dit geen bezwaar is (pag. 20). Men kan nu echter zien dat dit wel het geval is met het extract, verkregen door het fijngewreven mycelium met water uit te trekken. Hiervan is de P_H altijd te laag (4de kolom).

Dit blijkt dan ook zeer duidelijk uit de getallen voor het gehalte aan diastase, die bij deze zuurgraad werden verkregen (3de kolom), wanneer men ze vergelijkt met die, gevonden bij de juiste waterstofionenconcentratie, in het extract met de cultuurvloeistof dus (men zie ook de tabellen 7—9, 2de en 3de kolom; hierbij is de P_H niet vermeld, doch die week niet af van de overeenkomstige in tabel 3).

Het is van belang de hoeveelheden diastase in het mycelium te vergelijken met die, welke in de cultuurvloeistof werden gevonden. Wij zien in beide gevallen een sterke ontwikkeling van het enzym, die voortgaat tot den 7den dag, dan in de cultuurvloeistof een kleine daling vertoont om later te stijgen tot een veel grooter productie dan eerst was bereikt. De diastase in het mycelium echter vertoont in haar ontwikkeling geen algemeene stijging of daling doch slechts groote schommelingen. Iets dergelijks ziet men in de tabellen Nos. 2, 4, 8 en 9, voor resp. glucose 4 %, glucose 1 %, zetmeel

0.25 % + glucose 2.5 % en zetmeel 0.4 % + glucose 1 %.

Overall is daar de hoeveelheid diastase in het mycelium ten slotte zooveel minder dan in de vloeistof, dat men de eerste bijna kan verwaarloozen tegenover de laatste. De indruk, dien ik kreeg, is dat de schimmel haar diastase uitscheidt in de omringende vloeistof, zoodat de hoeveelheid die achterblijft in het mycelium, altijd eenigszins toevallig is.

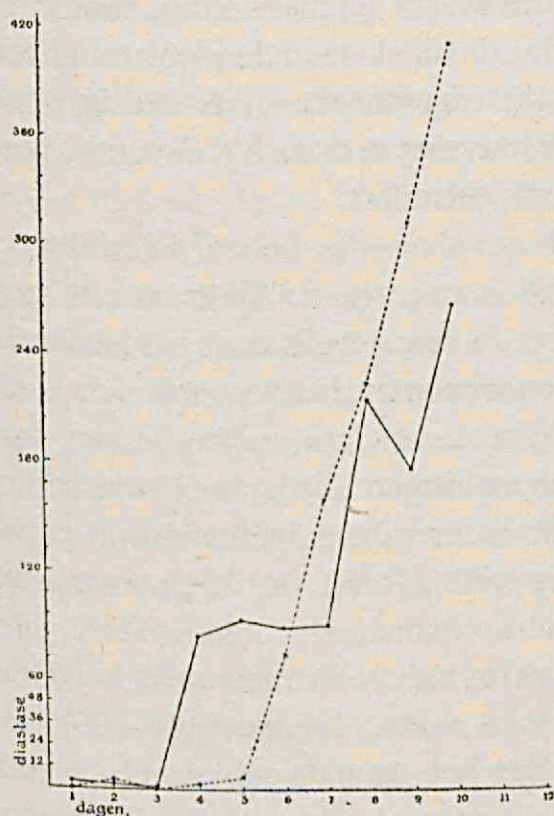
Dat deze hoeveelheid inderdaad zeer onbepaald is en afhankelijk van toevallige omstandigheden, wordt duidelijk geïllustreerd door de volgende tabel. Deze stelt voor de hoeveelheid diastase van een kleine serie, gekweekt op 0.5 % zetmeel, waarbij ik de cultuurvloeistof niet opkookte voordat het mycelium ermee werd uitgetrokken. Men heeft dus naast elkaar de reeksen getallen voor het enzym in mycelium + cultuurvloeistof en in de cultuurvloeistof alleen. Wanneer de diastase in het mycelium een grootheid van eenige betekenis of van zelfstandige waarde vertegenwoordigde, dan mocht men verwachten dat de eerste reeks getallen

dagen	diast. in myc. + cult.vloest.	diast. in de cult.- vloeist. alleen	drooggewicht in m.Gr.
3	0.75	0	17
4	84.5	3.45	35
5	93.8	6.8	50
6	90.5	75.—	56
7	90.3	160.8	74
8	214.9	225.—	96
9	177.25	312.—	130
10	266.8	410.7	118

(deze cijfers zijn alle gemiddelden uit minstens twee waarnemingen.)

steeds belangrijk hooger zou zijn dan de laatste. Nu ziet men dat die laatste waarden in het begin maar weinig kleiner, later zelfs grooter zijn. Slechts op den 4den en 5den dag schijnt er in het mycelium een grootere hoeveelheid diastase aanwezig te zijn; daarna wordt zeer blijkbaar bijna alles in de cultuurvloeistof uitgezonden.

Fig. 2 stelt beide reeksen getallen graphies voor; het



valt daarbij op hoe veel regelmatigiger het verloop van de productie aan diastase in de vloeistof alleen (—) is dan van die in mycelium en vloeistof samen (-----).

Beschouwt men daarbij van de tabellen 7 en 9 kolommen 2 en 3, dan valt het op, dat er bijna niet de minste regelmatigheid bestaat in de verhouding van enzymhoeveelheid

Fig. 2. Diastase in myc. + cult.vl.st. (—); in het mycelium, diastase in de cult.vloeist. alleen (.....) wanneer dat met

water of met cultuurvloeistof is uitgetrokken. Men zou verwachten dat zonder uitzondering het extract met water een veel lager diastasegehalte zou vertoonen. Dit

is lang niet altijd het geval, ja soms is het zelfs hoger. Daarentegen komen de hoeveelheden diastase in de beide cultuurvloeistoffen vrij goed overeen; er zijn verschillen, vrij belangrijke zelfs op een zelfden dag, maar het algemeene verloop is voor beide hetzelfde. Dit versterkte mijn indruk dat de hoeveelheid enzym in het mycelium slechts toevallig is.

De afscheiding van het enzym nu geschiedt reeds in het eerste stadium van sterke ontwikkeling, zoodat ik niet kan aannemen dat de diastase in de vloeistof alleen afkomstig zou zijn uit afgestorven of toevallig open gegane cellen; m.i. is het enzym door het levende protoplasma naar buiten getreden.

Bij het bespreken van de series behoef ik niet veel meer te zeggen over den zuurgraad. Alleen zou ik nog even in willen gaan op de vraag welk zuur het is, dat de hooge waterstofionenconcentratie veroorzaakt, ook omdat mijn proeven in dezen iets anders leeren dan eenige vroegere onderzoekingen. *Benecke* (4) vindt dat *Aspergillus niger* oxaalzuur vormt wanneer een organische verbinding als stikstofbron wordt gegeven. Bij ammoniumzouten echter wordt slechts het NH_4 ion verteerd, het NO_3 vormt salpeterzuur en dit belet de vorming van organische zuren. *Wehmer* (48—50) bevestigt dit; hij zegt dat het zuur de schimmel in haar ontwikkeling niet schaadt, wel echter de conidiënvorming tegenhoudt. Na eenigen tijd zou het zuur weer verdwijnen, daar basische afbraakproducten van eiwitten het neutraliseeren. Wij zullen zien dat deze twee laatste beweringen hoogstens slechts ten deele waar zijn. *Boas* en *Leberle* (14, 15) gingen de zuurgraad van

dag tot dag na; ook zij vonden bij voeding met NH_4NO_3 de sterkste zuurvorming niet alleen, maar ook een die slechts weinig terugliep; in tegenstelling met de zuurvorming bij organische stikstofbron, welke snel weer afnam, daar h.i. de schimmel het oxaalzuur zelf verteert. De resultaten van *Elfving* (25) kloppen vrijwel met de andere; hij noemt naast oxaalzuur ook citroenzuur. Daar de voedingswaarde hiervan echter hooger is, wordt het ook het snelst weer verteerd.

Het is echter heel jammer dat geen van deze onderzoekers hun proeven verder hebben uitgestrekt dan over 10 à 12 dagen. Bijna allen hebben een overdreven voorstelling van den invloed van het zuur op de schimmel, meenen dat dit meer of minder snel weer verdwijnt, een meening waartoe een zelfs kleine daling van den zuurgraad in de laatste dagen van hun proeven aanleiding geeft. Wanneer men de proeven slechts langer voortzet blijkt dit alles dadelijk. Men kan het zien in alle tabellen waarin de P_H is opgegeven.

Intusschen heb ook ik, bij voeding met NH_4NO_3 , nooit eenig spoor van organische zuren kunnen vinden.

Er schijnt wel een relatie te bestaan tusschen de hoeveelheid schimmelstof en de daaruit gevormde hoeveelheid zuur. Bij armelijke voeding n.l. 0.5 %—2.5 % wordt de P_H niet zoo hoog (2.9) als bij voeding op 4—5 % (1.8).

Evenmin zal ik in het vervolg nog veel aandacht behoeven te vragen voor het drooggewicht. De ontwikkeling daarvan, zooals we die zien in tabel N°. 3 is vrijwel die van alle series. De dagen waarin het maximum

werd bereikt verschilden meestal maar weinig. De hoogte van dat maximum varieerde zeer, maar bleek een functie te zijn van het aan de schimmel gegeven voedsel. Bij de meest rijkelijke voeding, d.w.z. dus voor zoover het zetmeel en glucose betrof, werd ongeveer 23 % in drooggewicht van de schimmel omgezet, bij de armelijkste 0.5 %, ± 31 %. Alle tusschenliggende hoeveelheden (1—1,4—2—2,5—2,75—4—4.1%) vertoonen percentages die zich regelmatig rangschikken tusschen deze beide uitersten. De graphische voorstelling hiervan, fig. 3, toont dit zeer duidelijk.

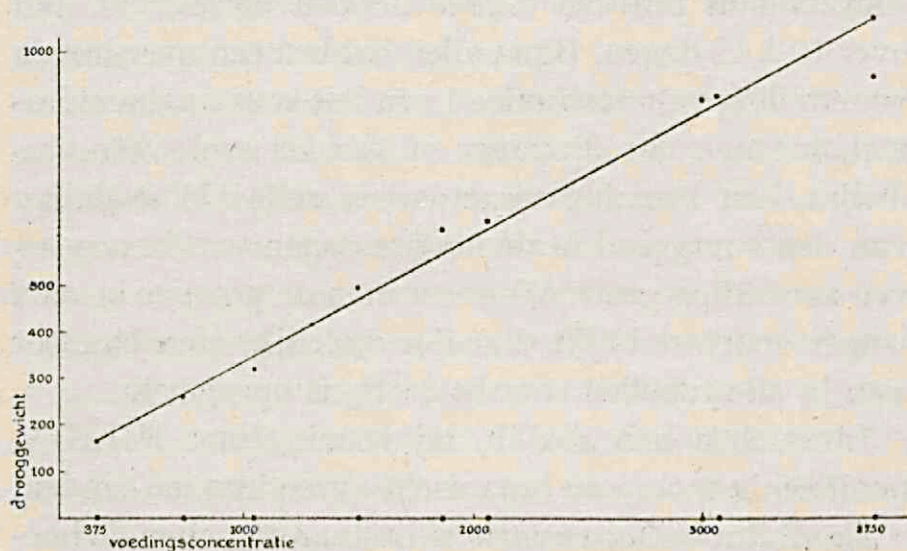


Fig. 3. Maximum drooggewicht bij verschillende concentratie van voeding (de hoeveelheid hiervan uitgedrukt in m.Gr.)

Om den lezer hinderlijk veel zoeken in de tabellen te besparen zal ik bij het noemen van een serie er steeds tusschen haakjes aan toevoegen op welke dagen het maximum gewicht was bereikt en hoeveel dit bedroeg in milligrammen; b.v. glucose 4 % (13—16; 912). Want het is altijd noodig te weten op welke dagen de

maximum-ontwikkeling wordt bereikt. *Pfeffer* heeft daar blijkbaar niet aan gedacht (42; l. c. pag. 257 noot) Hij bepaalde de drooggewichten pas op den 20sten—26sten dag van de culturen, kreeg dus getallen die niet met elkaar vergeleken mogen worden, die over het geheel weinig meer waard zijn.

In het vervolg interesseeren ons vnl. de getallen die de hoeveelheden diastase aangeven. Daar een enkele lijn beter en sneller overzicht geeft dan een reeks getallen, heb ik deze van de meeste series graphies opgeteekend. Daarbij golden voor mij de volgende overwegingen: de hoeveelheid diastase in de cultuurvloestof is meestal zooveel grooter dan die in het mycelium, dat eerstgenoemde, alleen opgegeven, een voldoende uitdrukking geeft van de diastaseproductie van de schimmel. Soms heb ik beide hoeveelheden opgeteld en in een lijn weergegeven; meestal verandert dit niet veel aan de hoofdzaken.

De getallen zijn echter weinig geschikt om zonder meer te gebruiken voor graphische voorstellingen; de schommelingen van den eenen op den anderen dag zijn soms vrij groot, wel niet groot genoeg om het beeld van den gang van het geheel te bederven, maar wel om het zeer te vertroebelen. Want deze schommelingen zijn het gevolg van verschillen tusschen de culturen en van waarnemingsfouten. Vooral bij de zeer korte omzettin-gen kunnen deze laatste hinderlijk zijn. Wanneer we vinden dat de cultuurvloestof van een schimmel op eenige achtereenvolgende dagen het volgend aantal minuten noodig heeft om het zetmeel om te zetten: 6—6.5—8—7—7.5—6—8,5 enz., dan geeft dat als

hoeveelheid enzym: 2500—2222—1875—2143—2000—2500—1765, getallen die graphies voorgesteld, groote schommelingen vertoonen, terwijl toch iedereen in zal zien dat we hier met een zelfde orde van grootheden te doen hebben. Ik achtte me dus gerechtigd om op alle getallen een zekeren dempingsfactor te leggen, die hun verschillen, welke essentiël zijn, duidelijk genoeg doet uitkomen, doch toevallige en nietsbeteekenende eenigszins vereffent. Ik meen dien te hebben gevonden in den zeer eenvoudigen maatregel om van alle getallen den logarithmus te nemen; in plaats van de bovenstaande reeks krijgen we dan: 3,38—3,35—3,27—3,33—3,30—3,38—3,25, hetgeen den werkelijken gang van zaken meer bevredigend weergeeft. Bij het beschouwen van de lijnen houde men dus steeds in het oog, dat de hoeveelheden diastase niet als zoodanig, doch door hun logarithmen zijn weergegeven; dit om mogelijke verwarringen te voorkomen wanneer men uit de lijnen de absolute hoeveelheden enzym wil opmaken.

Een nog eenvoudiger voorstellingswijze is de volgende: in plaats van het omgekeerd evenredige van den omzettingstijd, zet men dien tijd zelf af en wel op den ordinaat naar beneden toe. (zie fig. 8). Dit heeft echter een groot bezwaar: wanneer de omzettingstijden op een reeks dagen ongeveer de volgende zijn: 2000—800—110—35—12—4—3—3.5 min. enz. (iets dergelijks komt in het begin van de ontwikkeling zeer veel voor), dan moet men of den eersten of den laatsten getallen geweld aandoen om ze in een graphische voorstelling tot hun recht te laten komen, hetgeen dan toch nog meestal niet lukt. Waar deze maatregel zich echter

eenigszins liet toepassen heb ik het gedaan. Men zal zien dat dan in hoofdzaak het beeld gelijk blijft aan de logaritmenlijn.

Serie gekweekt op glucose 5 %
(11—19; 944.5) fig. 4, tabel IA.

GG: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5 %.

Serie op glucose 5 % (9—16; 1217) tabel IB

ZG: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op zetmeel 0.5 %.

Het is ten eerste de moeite waard om de tabellen betreffende deze series te vergelijken. De nawerking van het vorig milieu op de conidiën waarmee geënt werd, blijkt hier wel zeer duidelijk. Het drooggewicht wordt bij ZG opvallend veel hoger; conidiën worden in deze serie weinig gevormd en wel vnl. aan de randen van het mycelium. Het midden van de culturen bleef vrijwel wit. Bij GG echter waren de mycelia geheel zwart.

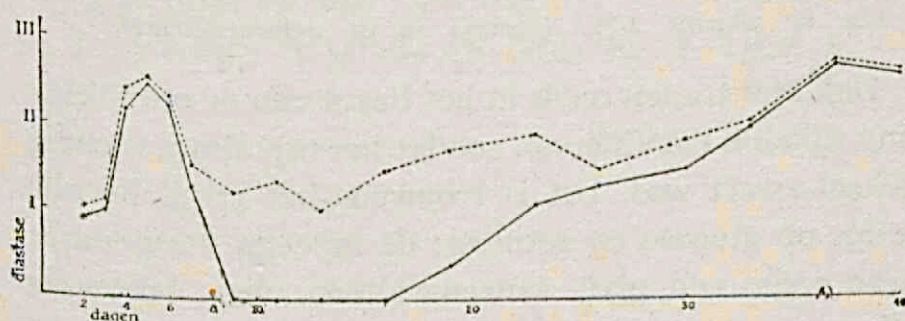


Fig. 4. Glucose 5 %. Diastase in myc. + cult.vloeist.; in cult.vloeist. alleen —.

De diastaseproductie is bij ZG uiterst gering; ik heb het niet de moeite waard gevonden die graphies voor te

stellen. Bij GG is deze wel van belang. Wij zien hier een vrij sterke stijging in beide lijnen n.l. voor de diastase in mycelium + cultuurvloeistof (—), zoowel als voor de cultuur vloeistof alleen (----); lang voordat het maximum gewicht bereikt is neemt die weer af. Op den 9den dag ongeveer is een minimum bereikt; voor de cultuurvloeistof alleen gaat dit zelfs door tot op 0. Later komt weer een stijging tot een hoeveelheid die nog overtreft, hetgeen in den beginne gevormd was.

Glucose 4 % (13—16; 912) fig. 5, tabel 2.

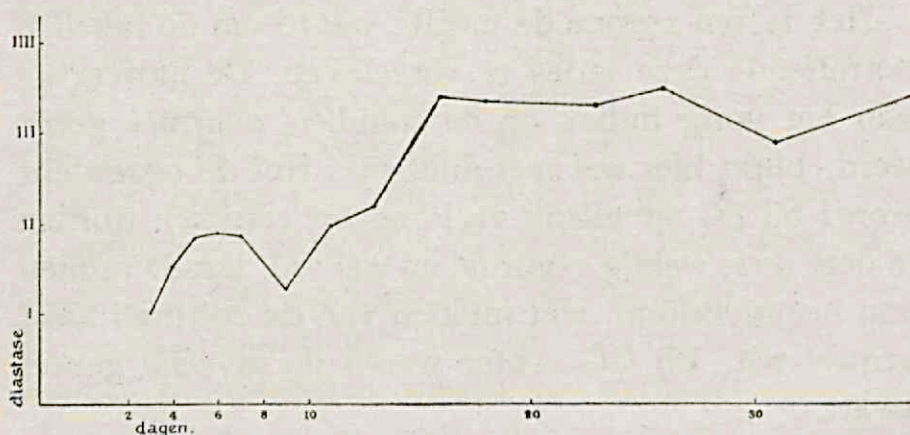


Fig. 5. Glucose 4 %. Diastase in de cultuurvloeistof.

Ook hier traden reeds in het begin van de ontwikkeling rijkelijk conidiën op, zoodat het mycelium spoedig geheel zwart was. Dit is trouwens het geval bij alle series op glucose en zetmeel; de mycelia vormden in deze series een plat, aaneengesloten vlies; alleen de allerzwaarste vertoonden daarin golvingen.

Het verloop van de diastasevorming lijkt veel op dat van glucose 5 %. Het eerste maximum is hier minder hoog, doch de daling daarna gaat minder ver door; deze bereikt haar laagste punt op den 9den dag. De

tweede stijging begint vroeger en bereikt een veel hoger niveau.

Glucose 2.5 % (11—13; 615.5) fig. 6, tabel 3.

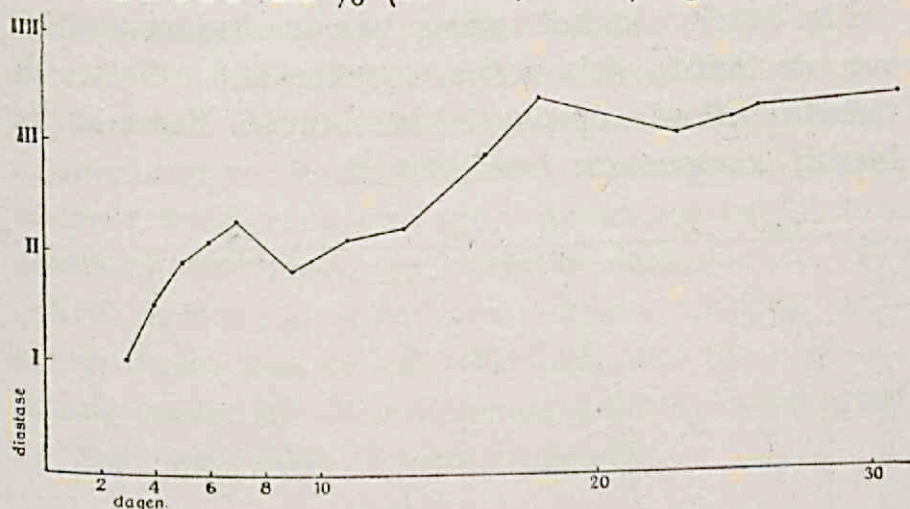


Fig. 6. Glucose 2.5 %. Diastase in de cultuurvloiestof.

Men ziet hier alweer een dergelijk verloop als bij de vorige series. De verschillen tusschen glucose 5 % en glucose 4 % zijn hier nog sterker uitgesproken. De daling, die nog veel minder diep gaat, bereikt haar laagste punt op den 9den dag.

Glucose 1 % (9—16; 261) fig. 7, tabel 4.

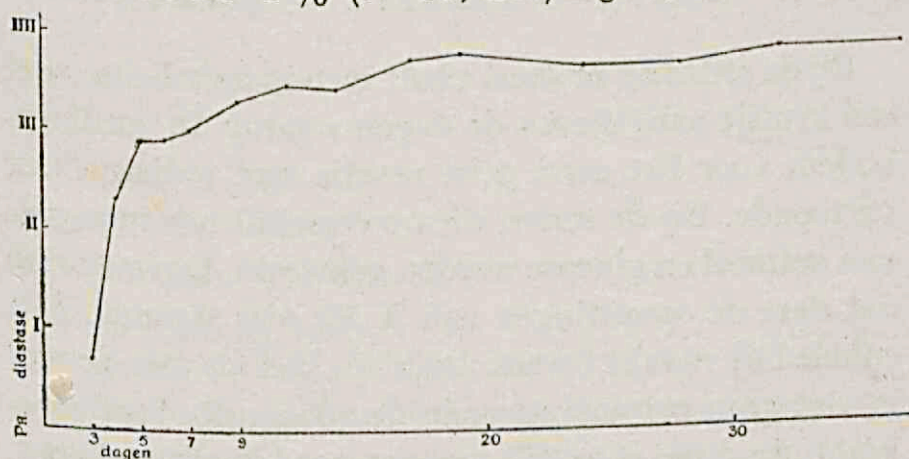


Fig. 7. Glucose 1 %. Diastase in de cultuurvloiestof.

Er is hier van geen daling meer sprake, hoogstens is er een flauwe aanduiding van over. Verder overtreft de enzymproductie alles wat we tot nog toe zagen.

Fig. 8 stelt voor het verloop van de diastasevorming van de laatste drie series, opgeteekend volgens de tweede methode, op pag. 30 beschreven. Men ziet dat hierbij commentaar overbodig is.

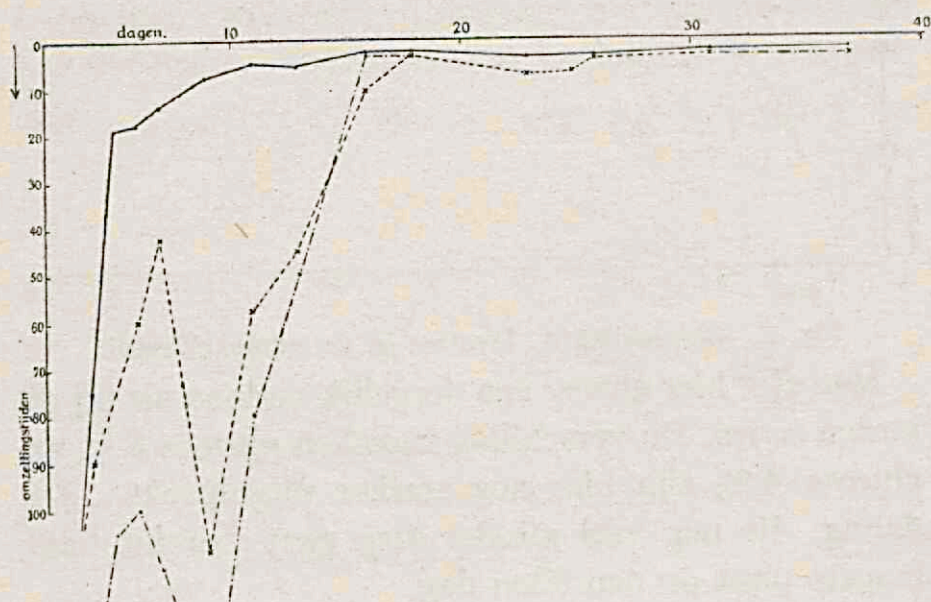


Fig. 8. Glucose 1 % —; glucose 2.5 %; glucose 4 % -----.

Bij de series op zetmeel vindt men in de tabellen met een kruisje aangegeven de dagen waarop de voedingsbodem voor het eerst geen reactie met jodium meer vertoonde. Bij de series, die op verschillende mengsels van zetmeel en glucose werden gekweekt, kan men zien dat deze de opvattingen van *Kylin* niet steunen. Een enkele blik maakt tevens duidelijk, dat als men zoover is, dat geen zetmeel meer in de voedingsbodem voorkomt, de proef eigenlijk nog pas goed beginnen moet.

Zoolang nog zetmeel in de cultuurvloeistof aanwezig was, werd het gehalte aan diastase daarin als volgt bepaald: twee hoeveelheden van de cultuurvloeistof werden vermengd met resp. gelijke volumina water en zetmeel 0.08 %; in beide mengsels was zoodoende de zuurgraad gelijk. De tijd, dien het mengsel met zetmeeloplossing meer noodig had, voordat de reactie met jodium uitbleef, werd gecenseerd aan te geven hoeveel diastase aanwezig was. Het is de vraag of deze methode wel geheel juist is; waar het hier echter slechts de aller-eerste dagen van de ontwikkeling gold, die nog van weinig belang zijn, heb ik gemeend dat het geen groot bezwaar was aldus te werk te gaan.

Zetmeel 2 % (11—22; 493) fig. 9 tabel 5.

Bij het steriliseeren van de kolven voor deze serie trad een neerslag van zetmeel op; dit werd uit eenige kolven gewogen en bleek in allen $\pm 8\%$ te bedragen van het geheele gewicht. Veel invloed kan het dus niet gehad hebben.

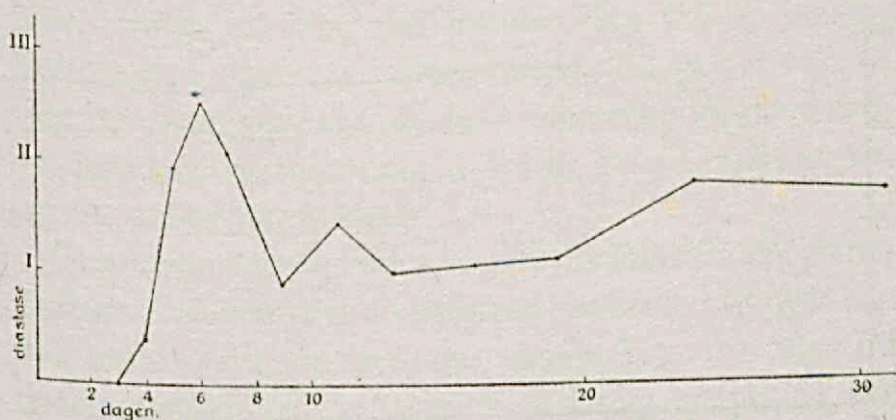


Fig. 9. Zetmeel 2 %. Diastase in de cultuurvloeistof.

Het verloop van de diastasevorming herinnert weer

sterk aan die bij de series op glucose 5, 4 en 2.5 %. De ontwikkeling was in het begin zeer langzaam; het maximum drooggewicht wordt dan ook later bereikt. De daling in de lijn heeft eerst op den 11den dag haar laagste punt bereikt.

Zetmeel 0.5 % (7—11; 155) fig. 10 (—) tabel 6A.
ZZ: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op zetmeel 0.5 %.

dito (9—13; 177.5) fig. 10 (.....), tabel 6B.
GZ: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5 %.

Ook deze parallelseries zijn een merkwaardig voorbeeld van de verschillen in de conidiën waarmee zij werden geënt. Evenals bij de twee series op glucose 5 % zien we meer drooggewicht bij de serie die met „vreemde” conidiën werd geënt. Tevens is hier de diastasevorming geringer en duurde het langer voordat het mycelium zwart was van de conidiën. Analoge verschillen dus, hoewel anders in verhouding.

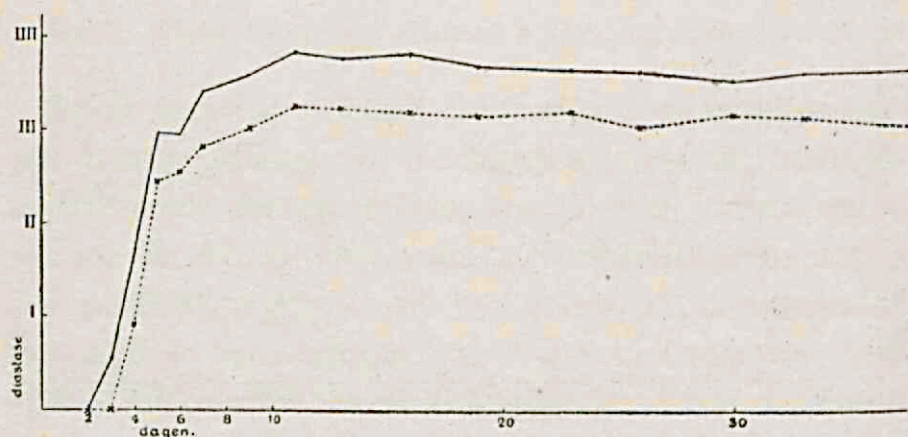


Fig. 10. Zetmeel 0.5 %. Diastase in de cultuurvloeistof.
ZZ —; GZ

Het verloop van de enzymvorming doet zeer denken aan die van glucose 1 %. De daling is in beide lijnen door een klein knikje aangeduid.

Bij een derde serie op zetmeel 0.5 % fig. 11, tabel

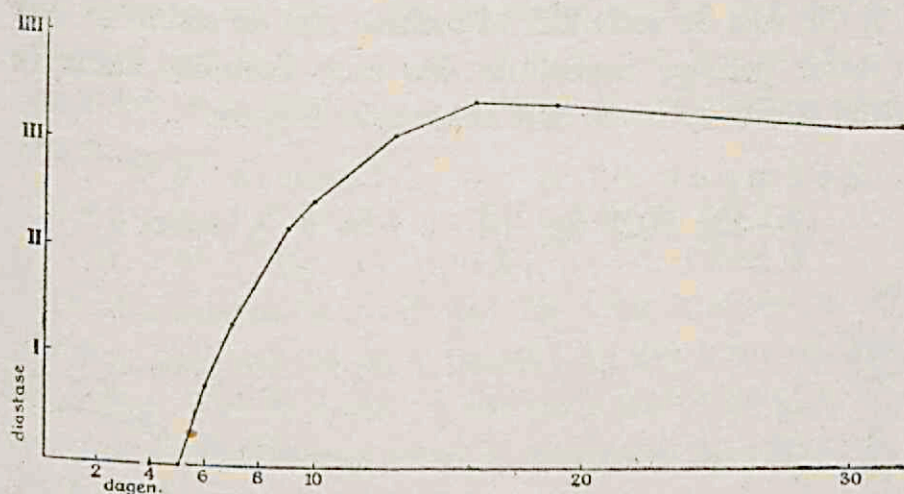


Fig. 11. Zetmeel 0.5 %. Diastase in de cultuurvloeistof.

6C, was een vrij groote hoeveelheid zetmeel tijdens het steriliseeren uitgevlokt. Dit heeft blijkbaar niet als voeding kunnen dienen, getuige ook het drooggewicht van den 13den dag: 116 m.Gr. We kunnen deze serie beschouwen als een, die minder dan 0.5 % voedsel heeft gehad en het is merkwaardig, dat in het verloop van de diastaseproductie hier zelfs elke kleinste aanduiding van een inzinking in de lijn zooals bij de andere series, achterwege bleef.

Deze serie diende voor speciale doeleinden, die weinig verband hielden met de proeven; daarom zijn ook niet alle waarnemingen gedaan, zooals b.v. die van het drooggewicht; ik kan daarom niet met zekerheid zeggen of dat van den 13den dag, het eenige dat gewogen werd (met dat van den 32sten dag, dat 95 m.Gr. bedroeg), tevens het maximale ontwikkelde gewicht

voorstelt; heel ver kan het er onmogelijk af zijn. Hoewel deze serie geënt werd met conidiën van een cultuur op 0.5 % zetmeel, van dezelfde voedingsbodem dus, blijft de diastaseontwikkeling toch belangrijk achter bij die van de serie ZZ. Misschien ligt de reden in het uiterst geringe mycelium dat zich vormde, maar ik durf hierover niets met zekerheid zeggen.

Zetmeel 0.1 % + Glucose 4 %
(9—13; 902) fig. 12 en 12A (—), tabel 7.

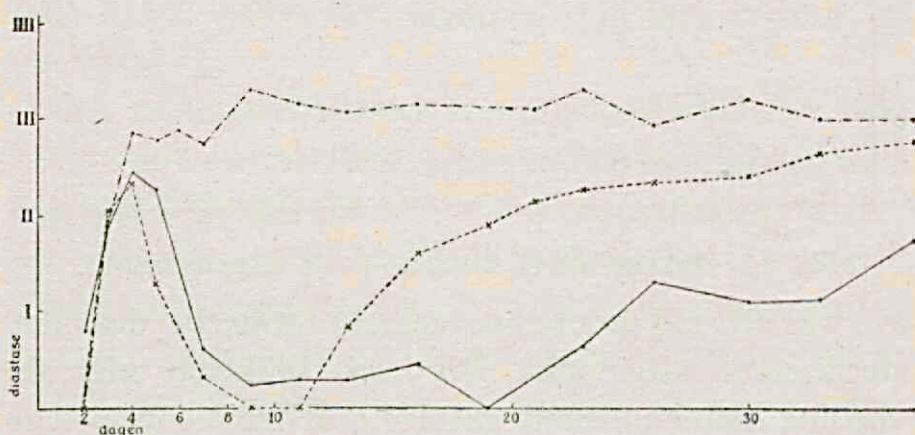


Fig. 12. Diastase in de cultuurvloeistof.

Zetmeel 0.1 % + Glucose 4 %: —.

Zetmeel 0.25 % + Glucose 2.5 %:

Zetmeel 0.4 % + Glucose 1 %: -.-.-

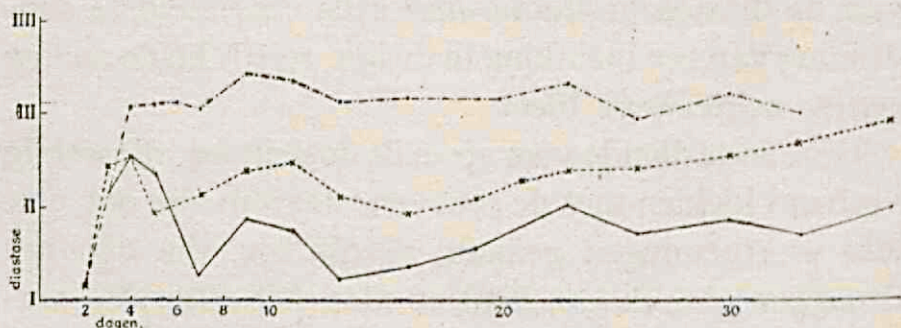


Fig. 12A. Diastase in mycelium + cultuurvloeistof.

Zetmeel 0.1 % + Glucose 4 %: —.

Zetmeel 0.25 % + Glucose 2.5 %:

Zetmeel 0.4 % + Glucose 1 %: -.-.-

De lijn voor de diastase in de vloeistof geeft weer een zelfde beeld als bij glucose 4 %. Op den 9den en 19den dag bereikt de daling haar laagste punt; de stijging daarna is veel geringer dan we het totnogtoe zagen. De lijn voor de enzymproductie in mycelium + cultuurvloeistof (fig. 12A —) zegt niet veel; men kan er het nu reeds bekende verloop misschien uit opmaken doch uitgesproken is dit niet.

Zetmeel 0.25 % + Glucose 2.5 %
(7—13; 636.5) fig. 12 en 12A (.....), tabel 8.

De diastase in de voedingsbodem biedt alweer niets nieuws; het laagste punt bereikt de lijn weer op den 9den dag. Wat de totale productie betreft (fig. 12A....), ook hier is, voorloopig althans, weinig uit op te maken. Ik kom hierop terug.

Zetmeel 0.4 % + Glucose 1 %
(7—13; 357) fig. 12 en 12A (-----), tabel 9.

Het verloop van deze serie herinnert sterk aan dat van glucose 1 %. Beide lijnen geven hier vrijwel hetzelfde beeld.

B. CONCLUSIES.

Al de lijnen die ik nu besproken heb, maken wel heel duidelijk dat het er voor de vorming van diastase niets toe doet of glucose dan wel zetmeel als voeding wordt gegeven. De belangrijke verschillen schijnen een gevolg te zijn van de hoeveelheid voedsel, niet van den aard daarvan.

Ik meen nu mijn resultaten als volgt te mogen interpreteren: het normale verloop van de vorming van diastase is een productie, die stijgt tot een maximum

bereikt is. Dan wordt geen diastase meer geproduceerd, doch hetgeen aanwezig is behoudt zijn kracht voor onbepaalden tijd. Dit verloop vertoont zich slechts bij zeer geringe voeding, n.l. bij minder dan 0.5 %; is de voeding rijkelijk, dan scheidt het mycelium in veel sterker mate stoffen uit in de omringende vloeistof waaronder er zijn (eiwitten?), die de diastase adsorberen of op andere wijze onwerkzaam maken. Dit begint reeds in de eerste dagen van de ontwikkeling, zoodat niet alleen het normale maximum niet bereikt wordt, doch in de dagen, waarin het mycelium zijn grootste gewicht ontwikkelt, wordt de diastase zoo sterk aange-tast dat er na een top weer een daling komt, die dieper gaat naarmate er meer van die stoffen geproduceerd worden, d.w.z. naarmate het gewicht van het mycelium grooter is of wel naarmate de voeding rijkelijker is. Het verbaast ons dan ook niet te zien, dat het laagste punt van de lijn altijd bereikt wordt midden in de dagen waarop het drooggewicht maximaal is. Langzamerhand gaan echter die stoffen in ontbinding over of worden door de schimmel geëssimileerd, hoe het zij, ze laten de diastase los zoodat deze weer werkzaam kan worden en wel ten volle, zoodat nu pas de werkelijke hoeveelheid enzym, die de schimmel geproduceerd heeft, te voorschijn komt. De lijn stijgt dan tot ver boven het eerst bereikte maximum en blijft daar ¹⁾. Het is nu ook dui-

¹⁾ Misschien mogen we de plotselinge, vrij groote hoeveelheid diastase, die optreedt op den laatsten dag van waarneming bij serie ZG, tabel 1B, als een begin van dit „vrijkomen” beschouwen. Het drooggewicht in deze serie was hoog: 1217 m.Gr., zoodat men zich kan voorstellen dat de diastase steeds vrijwel geheel gebonden was, nu echter, zij het laat, toch nog vrij gaat komen. Intusschen is dit eene getal voor een dergelijke conclusie natuurlijk nog niet voldoende.

delijk waarom de lijnen die de productie van mycelium + vloeistof weergeven, zooals die in fig. 12A, soms een verloop vertoonen waaruit zoo weinig valt op te maken. Immers, het enzym in het mycelium was blijkbaar niet onder invloed van de belemmerende factoren in de vloeistof; het heft dus de daling die de diastase in de vloeistof vertoont, wanneer ze afzonderlijk graphies wordt voorgesteld, gedeeltelijk op, waardoor het algemeene verloop in die lijnen vertroebeld wordt.

Men zou ook kunnen denken dat het nog aanwezig zijn van suikers in de vloeistof de omzetting van het zetmeel vertraagt, doordat het evenwicht bij de reactie verschoven wordt. Dit gebeurt inderdaad, wanneer men een oplossing van maltose voegt bij het mengsel enzym-zetmeel. Ik verkreeg hiervoor de volgende gegevens: een oplossing van diastase, die het zetmeel in 185 sec. omzette, deed dit in een milieu dat 1 % maltose bevatte in 440 sec., bij 2 % maltose in 1140 sec. Daar de diastase van *Aspergillus niger* het zetmeel tot maltose splitst (zie pag. 43 noot), komen de series op glucose niet in aanmerking bij deze kwestie en wat betreft de series waar ook zetmeel als voeding diende, hier kan misschien in de eerste dagen de maltose een remmende factor zijn. De hoofdoorzaak ligt echter niet hier; men bedenke slechts, dat de daling altijd het sterkst is na de geheele vertering van het voedsel.

De werkelijke hoeveelheid enzym, die tenslotte te voorschijn komt, blijkt altijd even groot te zijn, ongeacht de concentratie van de voeding. Tenminste, bij de series op 0.5—2.5 % zien wij dat steeds ongeveer hetzelfde hoge maximum bereikt wordt. Die van 4 %

komen daar niet geheel aan toe, doch het is aan te nemen dat het langer duurt voordat alle belemmeringen voor de diastase zijn weggenomen, daar ze in grooter hoeveelheid aanwezig waren. Ditzelfde geldt natuurlijk in nog sterker mate voor de series op 5 %.

We zien dus, dat noch de aard, noch de concentratie van de voeding invloed uitoefenen op de diastaseproductie, tenminste voorzoover betreft zetmeel en glucose. De concentratie kan slechts tijdelijk den gang van zaken verstoren. Fig. 11 van de derde serie op zetmeel 0.5 % is daarom de eenige, die een juiste voorstelling geeft van het verloop van de vorming van diastase.

Eenige belangrijke feiten staven m.i. de hier beschreven opvatting. Men zie fig. 13 tabel 10 voor een serie op maltose 5 % (11—13; 1040.5). Het eerste ma-



Fig.13. Maltose 5 %. Diastase in de cultuurvloeistof.

ximum wordt hier wel gevolgd door een daling, maar deze is veel minder diep dan bij glucose 5 % en wordt gevolgd door een stijging, die ook veel minder hoog komt. Nu produceert *Aspergillus niger* blijkbaar zeer weinig maltase. Het duurt tenminste lang, voordat de

maltose uit de cultuurvloeistof verdwijnt; waar glucose en andere voedingsstoffen meestal reeds op den 10den à 12den dag waren opgeteerd, is hier op den 24den en zelfs op den 31sten dag nog vrij veel suiker aanwezig ¹⁾, hetgeen ook wel blijkt uit de draaiing van de cultuurvloeistof. Deze is bij andere series op den 10den à 12den dag = 0, hetgeen ongeveer samenvalt met het bereiken van het maximum aan drooggewicht; hier is die op den 24sten dag nog = $1^{\circ}23'24''$, waarop ook het drooggewicht nog maar weinig is teruggelopen, nl. tot 911 m.Gr. Wel heeft de dissimilatie dus de overhand gekregen, maar er wordt toch blijkbaar altijd nog geassimileerd tevens en tegelijkertijd worden dus hoogstwaarschijnlijk stoffen geproduceerd, die de diastase beletten haar volle kracht te ontplooien. Hier treedt de maltose zelf zeker ook als remmende factor op. Wanneer de serie langer was voortgezet, zou ongetwijfeld ook de groote hoeveelheid enzym, die we bij andere series waarnemen, zijn opgetreden. Helaas ontbraken mij de noodige culturen daartoe en de tijd om die te maken.

¹⁾ Uit de getallen voor de draaiing van de cultuurvloeistof kan men opmaken dat, zooals ook te verwachten was, *Aspergillus niger* de maltose splitst tot glucose. Waar daar echter zoo lange tijd voor nodig blijkt te zijn, kan men niet anders aannemen dan dat bij de omzettingen van zetmeel, die alle meest snel verlopen, als eindproduct maltose ontstaat. Ik werd in deze meening nog versterkt door een ander feit: bij de derde serie op 0.5 % zetmeel werd in den beginne elken dag nagegaan hoe groot het reduceerende vermogen was van de cultuurvloeistof. Toen het zetmeel daaruit geheel verdwenen was (op den 9den dag), bleek het reduceerend vermogen even groot te zijn als van een oplossing van 0.4 % maltose; d.w.z. er waren toen bijna even groote hoeveelheden van cultuurvloeistof als van een oplossing van 0.4 % maltose nodig, om eenzelfde volumen van Fehling's proefvocht te reduceeren. Dit is nog wel geen bewijs, maar maakt de veronderstelling toch wel zeer waarschijnlijk.

Een groot aantal uitkomsten, die ik verkreeg bij een heel ander soort waarnemingen, steunen m.i. eveneens de conclusies, die ik hierboven heb uiteengezet. Tenminste, zij worden op zeer aannemelijke wijze door mijn opvatting verklaard.

Zooals ik reeds mededeelde werden de cultuurvloei-stoffen, voor zoover er na de proefnemingen nog wat van over was, bewaard. Van dag tot dag of van week tot week werd nagegaan of de kracht van de diastase al of niet afnam. Het is niet goed mogelijk om de uitkomsten, die ik hiermee verkreeg, hier alle neer te schrijven: het zijn er eenige honderden. Noodig is dit trouwens niet, want van een groot aantal ervan kan ik met eenige woorden zeggen wat ze leeren.

De vloeistoffen van de drie series op zetmeel 0.5 % behielden hun kracht voor onbepaalden tijd; zelfs diegenen, die na $\pm$ tien maanden onderzocht werden op hun gehalte aan diastase, bleken ook toen nog een zetmeeloplossing van 0.08 % in den zelfden tijd om te zetten als op den dag, waarop ze van de schimmel werden afgefiltreerd. Er zijn hierop eenige uitzonderingen en wel in de serie GZ. Men herinnert zich, dat in deze de hoeveelheid mycelium, die gevormd werd, het grootst was van de drie; het bereikte zijn maximum op den 9den tot den 13den dag. De vloeistoffen van deze dagen nu vertoonen een teruggang van het enzym en wel was na 34 dagen van de oorspronkelijke kracht over:

in de vloeistof van den					7den dag	50%
"	"	"	"	"	9den	" 60%
"	"	"	"	"	11den	" 78%
"	"	"	"	"	13den	" 82%

In deze vloeistoffen waren dus in voldoende mate stoffen afgescheiden die de werking van het enzym remden.

Van de serie ZZ was een cultuur overgebleven, die ik op den 175sten dag na de enting op de bekende wijze behandelde. Ik verwachtte, dat de afbraakproducten van het mycelium de diastase geheel onwerkzaam gemaakt zouden hebben. Toch bleek er nog een hoeveelheid diastase = 577 aanwezig te zijn, vrij belangrijk dus en wat meer zegt, na ± 7 maanden was nog 72 % van de kracht in deze vloeistof over. Nu bedroeg het drooggewicht van dien 175sten dag 110 m.Gr., nauwelijks minder dus dan op den 40sten tot 50sten dag van deze serie. Van een vergaande afbraak kan dan ook nog geen sprake zijn geweest en dit verklaart ook wel het betrekkelijk hooge enzymgehalte.

Van de serie op zetmeel 2 % (11—22; 493) konden slechts de vloeistoffen van de laatste vier dagen van waarneming bewaard worden, t.w. van den 29, 32, 36 en 45sten dag. De groote stijging was op den 29sten dag al lang begonnen, het enzym moest reeds grootendeels „vrij” zijn. Ik mocht dus verwachten dat ook in deze vloeistoffen de diastase mettertijd niet of weinig aan kracht zou verliezen. Dit bleek ook zoo te zijn: in de vloeistof van den:

29sten dag	was na	62 dagen	nog over	82%
32sten	„ „ „	124	„ „ „	100%
36sten	„ „ „	131	„ „ „	90%
36sten	„ „ „	223	„ „ „	75%
45sten	„ „ „	131	„ „ „	78%

Het is duidelijk wat men nu kan verwachten van de

series op 1—2.5—4 en 5 % glucose; n.l. bij 1 % zullen de vloeistoffen van de meeste dagen volmaakt constant van kracht moeten zijn; hoogstens zullen enkele in de dagen van maximaal drooggewicht na eenigen tijd hun diastatische werkzaamheid langzamerhand verliezen. Hoe hoger de concentratie van de voeding, hoe meer vloeistoffen niet constant zullen blijken te zijn, des te sneller zullen ze tevens hun kracht verliezen.

Deze verwachtingen komen ook vrijwel uit; bij glucose 1 % (9—16; 261) waren niet constant de vloeistoffen van den 5den tot den 9en dag; hiervan was na 12 dagen nog over:

in de vloeistof van den	5den dag	69 %
„ „ „ „ „	6den „	70 %
„ „ „ „ „	7den „	50 %
„ „ „ „ „	9den „	62.5 %

Voor glucose 2.5 % (11—13; 615.5) gold hetzelfde voor den 5den tot den 18den dag en wel was na 12 dagen over:

in de vloeistof van den	5den dag	70%
„ „ „ „ „	6den „	86%
„ „ „ „ „	7den „	61%
„ „ „ „ „	11den „	8%
„ „ „ „ „	13den „	16%
„ „ „ „ „	16den „	9%
„ „ „ „ „	18den „	62%

Met ziet, dat het grootere drooggewicht zich reeds sterk laat gelden; dit is ook het geval bij de serie op glucose 4 % (13—16; 912). Hier was in de vloeistoffen van den 5den dag tot den 18den dag nog over van de diastatische werkzaamheid na 10 dagen:

in de vloeistof van den	5den dag	56%
„ „ „ „ „	6den „	46%
„ „ „ „ „	7den „	33%
„ „ „ „ „	11den „	16%
„ „ „ „ „	13den „	7.8%
„ „ „ „ „	16den „	86%
„ „ „ „ „	18den „	50%

Tevens waren in deze serie de vloeistoffen der laatste dagen ook niet meer geheel constant; na twee maanden had hier de diastase meestal 20 à 30 % van haar kracht verloren.

Glucose 5 % (11—19; 944.5); van deze serie zijn slechts de vloeistoffen der laatste dagen bewaard gebleven; uit fig. 4 is al te zien dat het enzym hier niet geheel „vrij” komt. Het is dus begrijpelijk, dat zelfs op deze dagen de diastase haar kracht vrij snel blijkt te verliezen. Na 6 dagen was nog maar over:

in de vloeistof van den	33sten dag	8%
„ „ „ „ „	37sten „	9%
„ „ „ „ „	40sten „	50%
„ „ „ „ „	46sten „	10%

Wij kunnen hieruit m.i. veilig de conclusie trekken dat in deze serie geen vloeistof haar kracht lang behouden heeft.

Ik kon niet altijd alle vloeistoffen zoo lang bewaren als ik wilde, om de eenvoudige reden, dat ze na zekeren tijd waren opgebruikt. Daarom is het mij niet mogelijk geweest de getallen, die ik voor deze series gaf, te ontnemen aan waarnemingen, die alle na een gelijk aantal dagen zijn gedaan. Ik zou dat aantal wel voor alle series gelijk kunnen maken, maar moet dan de resultaten op-

geven voor het kleinst aantal dagen gedurende welke bij één van die series de waarnemingen werden gedaan, i.c. 6 bij glucose 5 %; in de meeste gevallen geven de resultaten dan geen overzicht meer. Toch illustreeren zij m.i. ook zoo duidelijk genoeg den invloed, dien de meerdere of mindere schimmelstof uitoefende en wel sterker, naarmate het mycelium meer drooggewicht had ontwikkeld.

De serie op maltose gaf in dezen slechts weinige en onsamenhangende resultaten.

Zetmeel 0.1 % + glucose 4 % (9—13; 902): geen teruggang in de vloeistoffen van den 3den en 4den dag; verder zijn geen waarnemingen gedaan.

Zetmeel 0.25 % + glucose 2.5 % (7—13; 636.5). Na 6 dagen was nog over:

in de vloeistof van den	4den dag	30%
„ „ „ „ „	18den „	24%
„ „ „ „ „	19den „	20%
„ „ „ „ „	21sten „	21%
„ „ „ „ „	23sten „	12%

Van de latere dagen verloren de vloeistoffen na langeren tijd niet meer dan ongeveer 15 %.

Zetmeel 0.4 % + glucose 1 % (7—13; 357). Na 12 dagen was nog over:

in de vloeistof van den	4den dag	54 %
„ „ „ „ „	5den „	7.5 %
„ „ „ „ „	9den „	2.5 %
„ „ „ „ „	11den „	11 %
„ „ „ „ „	13den „	13 %

De invloed van de schimmelmasa is hier veel sterker

dan ik had verwacht bij een zoo betrekkelijk gering drooggewicht.

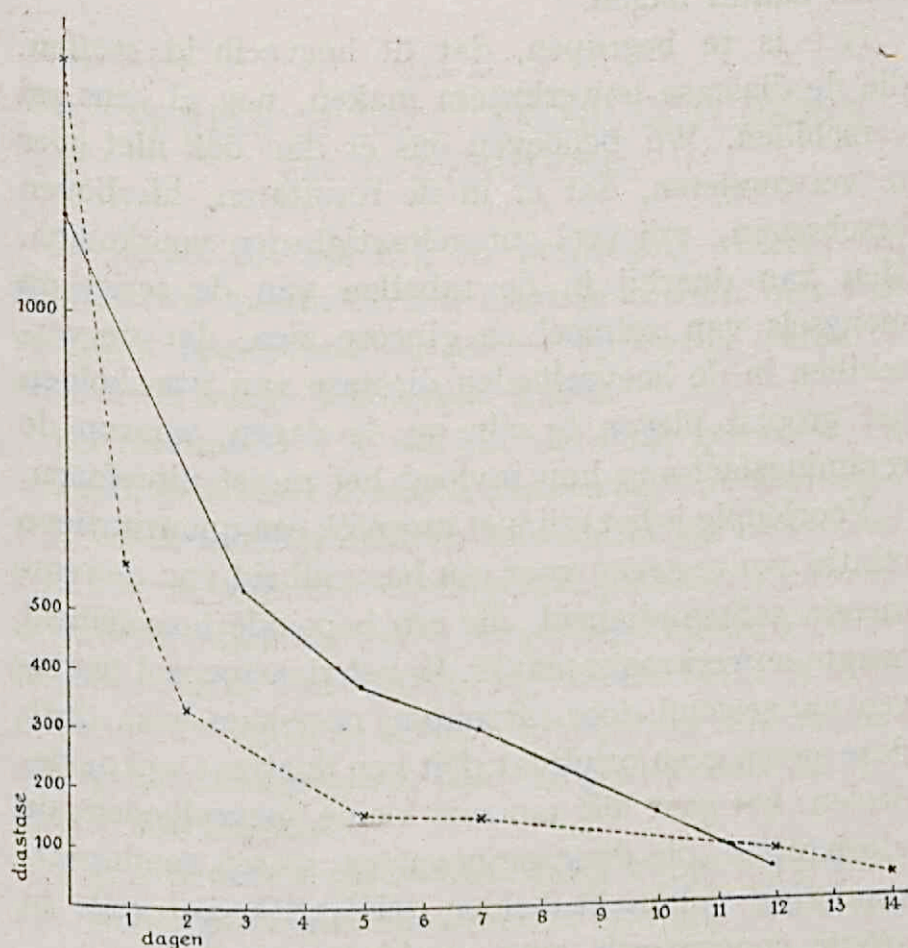


Fig. 14. Teruggang van de diastatische kracht in de cultuurvloeistof. Serie op zetmeel. 0.4 % + glucose 1 %; 11de (.....) en 13de dag (—).

Fig. 14 stelt voor het verloop van den achteruitgang van de diastatische kracht in de vloeistoffen van den 11den (.....) en 13den dag (—) van laatstgenoemde serie. Deze lijnen toonen duidelijk aan, dat het onwerkzaam maken van de diastase plaats heeft volgens de wet van de massawerking. Het is daarom onge-

wenscht de resultaten van snelle en langzame afname van kracht met elkaar te vergelijken na een gelijk, klein aantal dagen.

Het is te begrijpen, dat de hoeveelheid stoffen, die de diastase onwerkzaam maken, nog al eens zal verschillen. We behoeven ons er dan ook niet over te verwonderen, dat er in de resultaten, hierboven beschreven, vrij veel onregelmatigheden voorkomen. Men kan daarbij in de tabellen van de series op mengsels van zetmeel en glucose zien, dat de verschillen in de hoeveelheden diastase van twee kolven het grootst plegen te zijn op de dagen, waarop de remmingsfactoren hun invloed het meest uitoefenen.

Voorloopig is het mij niet mogelijk een quantitatieve relatie aan te geven voor een hoeveelheid van de remmende zelfstandigheid, die een bepaalde hoeveelheid enzym onwerkzaam maakt. Ik heb daartoe wel pogingen aangewend door uitzouten, neerslaan enz., doch deze gaven geen resultaat. Dit kan ik alvast wel mededeelen: het gaat hier om zeer kleine hoeveelheden; de vloeistoffen, die diastase bevatten, waren zonder uitzondering volmaakt helder, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gaf zelfs in groote concentratie geen merkbaar neerslag.

V. SERIES OP SACCHAROSE GLYCERINE EN MELKSUIKER.

De series, die mij nog ter bespreking overblijven, hebben, wat productie aan diastase betreft, niet veel resultaat opgeleverd. In andere opzichten leeren ze echter wel eenige belangrijke dingen.

Op saccharose 5 % werden vier series gekweekt, en wel één, geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5%, één, geënt met conidiën van een cultuur op saccharose 5% en twee, die een dergelijke parallelserie vormden, doch waaraan waren toegevoegd kleine hoeveelheden ZnSO_4 en FeSO_4 (0.0025%; *Raulin* (44)). Ik wilde n.l. onderzoeken of de bekende uitwerking van die zouten op het drooggewicht, ook zou gelden voor de productie van diastase.

Alle vier deze series vormden een zwaar mycelium, dat sterke golvingen vertoonde in zijn oppervlak. De culturen, waaraan ijzer en zink waren toegevoegd, waren vrij sterk citroengeel gekleurd onder invloed van het ijzer; het mycelium was hier zeer bros, kon niet dan in vele stukken uit de kolven gehaald worden. Conidiën werden ongeveer niet gevormd, hoogstens aan de randen, terwijl daarentegen de culturen zonder zink en ijzer na eenigen tijd met een niet zeer dichte laag conidiën overdekt waren.

Saccharose 5 % (28—37; 1058) tabel 11A.

GS: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5 %.

Saccharose 5 % (18—220; 989) tabel 11B.

SS: d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op saccharose 5 %.

De diastase in de cultuurvloeistof is in beide series zeer onbeduidend; in het mycelium van GS treedt vanaf den 13den dag een kleine hoeveelheid op, die vrij constant blijft, zoolang als de waarnemingen duurden. In SS komt ook deze diastase niet voor, tenminste, de hoeveelheden in deze serie zijn zoo gering, dat ik meen ze te mogen verwaarloozen. Men ziet, dat de omzetting van de saccharose en de vertering van de invertsuiker in beide series ongeveer even langen tijd in beslag namen; waarom het maximum aan drooggewicht in GS later bereikt wordt dan in SS is mij niet duidelijk.

Saccharose 5 % + Fe⁺⁺ + Zn⁺⁺

(11—16; 1426) tabel 12A

GS': d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5 %.

Saccharose 5 % + Fe⁺⁺ + Zn⁺⁺

(11—18; 1417) tabel 12B.

SS': d.w.z. geënt met conidiën van een cultuur op saccharose 5 %.

Men ziet, dat het drooggewicht hier werkelijk meer bedraagt dan in de series, waarin geen zink- en ijzerionen aanwezig waren; tevens werd het maximum veel sneller bereikt.

Verder treedt hier in het mycelium van GS' een hoeveelheid diastase op vanaf den 11den dag, die op den 26sten weer verdwenen is. Deze hoeveelheid is on-

geveer het dubbele van de overeenkomstige bij GS, hoogstwaarschijnlijk onder den invloed van de ijzer- en zinkionen. Evenals in SS, is ook in SS' deze geringe productie weer verdwenen; dit is in dit geval het eenige verschil, dat de herkomst van de conidiën verraadt. Intusschen is zooiets genoeg om absolute tegenspraak te veroorzaken in de resultaten van onderzoekers, die zich alleen bekommeren om de enzymen, die een schimmel in haar mycelium bevat en er niet op letten, uit welke conidiën zij hun culturen verkrijgen.

Het is opvallend, hoe weinig diastase op saccharose gevormd wordt. Voor zoover ik dat kon nagaan, hebben andere onderzoekers nooit een zoo groot verschil tusschen de diastaseproducties op glucose, zetmeel of saccharose gevonden. *Katz* (33) en *Kylin* (34) spreken van „reichliche Mengen”, zij het, dat bij hen de saccharose altijd vermengd was met 0.25 % zetmeel. Ook de meeste andere geven van dergelijke vage aanduidingen, waaruit intusschen toch wel valt op te maken, dat ze op saccharose nooit zoo opvallend veel minder diastase vonden dan op andere suikers. Misschien is het groote gewicht van het mycelium hier van invloed geweest. Dit kunnen we ons inderdaad voorstellen voor de series op saccharose + Fe^{++} + Zn^{++} ; waar dit 1426 en 1417 m.Gr. bedroeg en waarbij dan misschien nog een nadeelige invloed komt van het ijzer en zink. Bij de series SS en GS is het minder waarschijnlijk (989 en 1059); het eerste scheelt maar weinig met het maximum gewicht van de serie op glucose 5 %—GG: 944 m.Gr., terwijl bij deze toch een belangrijke hoeveelheid diastase voor den dag kwam. In elk geval blijft het

denkbaar dat deze kleine hoeveelheid meer aan drooggewicht, juist den doorslag geeft.

Wanneer dit alles waar is, kunnen we verwachten dat *Aspergillus niger*, gekweekt op een lagere concentratie van saccharose, b.v. 1 %, groote hoeveelheden diastase zal produceeren. Ik heb nagegaan of dit werkelijk het geval is, entte daartoe zes kolven op 1 % saccharose (met conidiën van een cultuur op 4 % glucose), waarvan ik telkens twee op den 7den, 14den en 21sten dag onderzocht. Het resultaat ziet men in de tabel:

dagen	diast. in het myc.	P _H van het myc. extract	diast. in de cultuur- vloeistof	P _H van de cultuur- vloeistof	droogge- wicht in m.gr.
7	25	6.5	18.7	6.65	54
14	23	3.05	21	2.95	274
21	50	2.65	524 ¹⁾	2.50	303

De ontwikkeling ging in het begin zeer langzaam, zoodat de 7de dag over het algemeen een negatief resultaat opleverde; op den 14den dag echter waren drooggewicht en zuurgraad zoodanig, dat een flinke hoeveelheid diastase verwacht mocht worden; desniettemin bleef die hier uit. Het is dus niet alleen de concentratie, maar ook de chemische aard van de saccharose, die zich hier doet gelden. Dat er nog onbelangrijke hoeveelheden diastase optreden, meen ik te mogen toeschrijven aan de nawerking van de 4 % glucose, vanwaar de conidiën kwamen, waarmee de kolven werden geënt.

¹⁾ Dit getal is het gemiddelde van de resultaten van waarnemingen, gedaan aan twee culturen.

Op den 21sten dag echter, is het resultaat werkelijk zooals dat werd verwacht; de hoeveelheid diastase, die toen in de cultuurvloeistof aanwezig bleek te zijn, is nog wel niet zoo groot als bij de serie op 1 % glucose, maar desniettemin is een groote stijging hier zoo onmiskenbaar, dat ik niet aarzel aan te nemen, dat deze mijn veronderstelling, hierboven uitgesproken, volkomen bevestigt.

Michaëlis en *Menten* (39) hebben onderzocht, welken invloed bijmengsels uitoefenen, wanneer ze worden gevoegd bij de combinatie enzym-substraat, i.c. invertase-saccharose. Zij vonden, dat er stoffen zijn, wier aanwezigheid de affiniteit van het enzym tot zijn substraat ten zeerste vermindert. De splitsingsproducten van de saccharose deden dat eenigermate, glycerine o.a. zeer sterk. Misschien moeten we saccharose en fructose als dergelijke bijmengsels voor de combinatie diastase-zetmeel beschouwen. Dat zou dan verklaren, waarom we op 5 % saccharose nauwelijks eenige productie aantreffen. De proef is nog niet lang genoeg voortgezet om de belemmeringen: eerst de saccharose en fructose, later het groote schimmelgewicht, te laten verdwijnen. Is dat eenmaal gebeurd, dan komt dus toch de diastase te voorschijn, zooals bij de kleine proef op 1 % saccharose.

Glycerine 5 % (28—33; 1021) tabel 13A
geënt met conidiën van een cultuur op glucose 5 %.

Glycerine 5 % (29; 998) tabel 13B
geënt met conidiën van een cultuur op glycerine 5 %.

De ontwikkeling op glycerine ging zeer langzaam; tenslotte echter werden eenige in elkaar gerolde, com-

pacte stukken mycelium gevormd, die los van elkaar bleven drijven. Zij waren lichtgrijs van de conidiën, die er dicht tegen aan zaten.

Zooals men in de tabel ziet, is in beide series de ontwikkeling van diastase niet noemenswaard. Hieruit mogen we dus nog niet besluiten dat *Aspergillus niger*, op glycerine gekweekt, geen diastase vormt. Eerst zou onderzocht moeten worden of op een lagere concentratie niet hetzelfde resultaat werd verkregen als bij 1 % saccharose. Voorloopig mogen we slechts constateeren dat, bij voeding op 5 % glycerine, de eventueele factoren, die een diastaseproductie verhinderen te voorschijn te komen, na een tijdsverloop van 52 dagen nog niet verdwenen zijn.

Op melksuiker 5 % werden eveneens twee parallel-series gekweekt. De schimmel heeft zich hierop bijna niet ontwikkeld. Bij *Aspergillus niger* schijnt geen lactase voor te komen en dus, waar noodig, ook niet geproduceerd te worden. De draaiing van de cultuurvloeistof, die op den eersten dag $2^{\circ}28'3''$ bedroeg, was op den 19den nog $2^{\circ}24'36''$. Er verschenen uiterst kleine en dunne vliesjes mycelium, die slechts zichtbaar waren door de conidiën, die zij droegen. De tabellen van deze series geef ik niet, ze zijn volstrekt onbelangrijk. Dat er geen productie van diastase plaats vond, is nauwelijks de moeite van het vermelden waard.

VI. SAMENVATTING DER RESULTATEN.

Het is noodzakelijk gebleken, voor men proeven doet met enzymen van schimmels, eerst te weten welke waterstofionenconcentratie voor de werking van die enzymen optimaal is. De zuurgraad voor de diastase van *Aspergillus niger* is in haar cultuurvloei-stof optimaal. Dit is niet het geval bij alle schimmels.

Het komt er ten zeerste op aan wat, de vorige voedingsbodem geweest is, waarvan de conidiën stammen waarmee men de culturen maakt voor het experiment. Men zorge ervoor, dat liefst conidiën worden genomen van culturen op een bodem van dezelfde samenstelling als die, waarop de proeven worden gedaan.

Aspergillus niger produceert groote hoeveelheden diastase en wel vanaf het begin van haar ontwikkeling in stijgende mate, tot een zeker maximum bereikt is. Dan wordt de productie stopgezet, doch de reeds aanwezige hoeveelheid blijft gedurende het verdere leven van de schimmel bestaan. Dit had plaats bij voeding met glucose, maltose en zetmeel. Noch de aard, noch de concentratie van een van deze stoffen was daarbij van invloed.

De concentratie van de voeding kan, wanneer die grooter is dan 1 %, tijdelijk de diastasevorming verstoren, doordat daarbij stoffen worden gevormd, die het enzym onwerkzaam maken. Wanneer die stoffen

mettertijd op een of andere wijze weer verdwijnen, komt de normale hoeveelheid diastase echter toch te voorschijn.

De diastase wordt direct na haar vorming in de cultuurvloeistof uitgescheiden.

De diastase verliest, zelfs na langen tijd, niets van haar kracht.

Saccharose oefent een nadeeligen invloed uit op het in werking treden van de diastase; zijn echter de saccharose en haar omzettingsproducten uit de cultuurvloeistof verdwenen, dan komt ook hier de diastase te voorschijn.

Bij voeding met 5 % glycerine werd geen productie van diastase waargenomen.

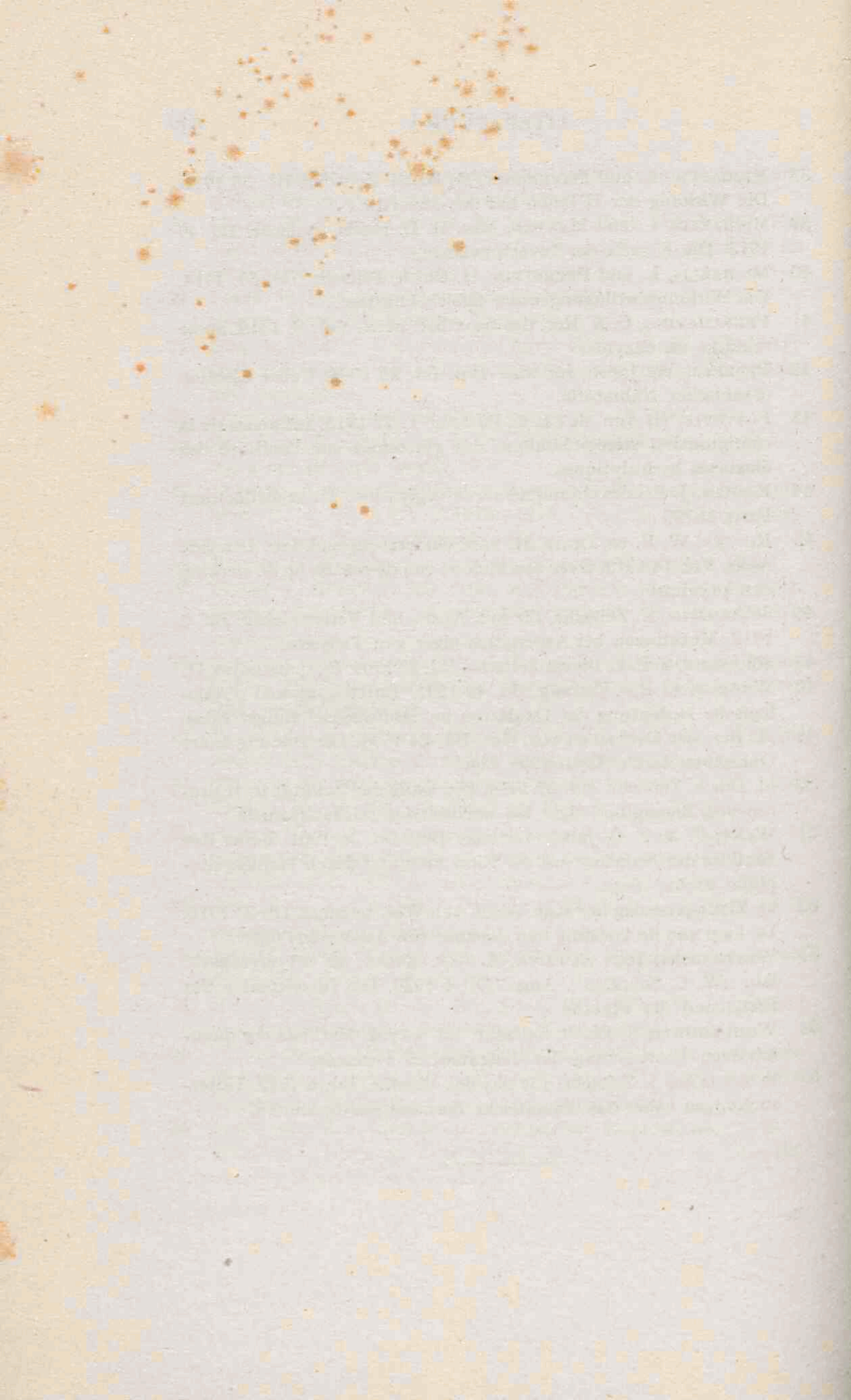
Bij *Aspergillus niger* komt geen lactase voor, ook niet wanneer de schimmel wordt gekweekt op melksuiker, zoodat daarop geen of een zeer geringe ontwikkeling plaats heeft.

VII. LITERATUUR.

- 1 ADLER, L. Biochem. Zeitschr. Bd. 77 1916. Ueber den Einfluss der Wasserstoffionen auf die Wirksamkeit der Malzdiastase.
- 2 BARNETT, G. D. and BARNETT, C. W. Proc. Soc. of Exp. Biol. and Med. Vol. 18 1920. Colorimetric determination of H^+ concentration by means of a doublewedge comparator.
- 3 BAYLISS, W. M. Principles of general Physiology. London—New-York 1918.
- 4 BENECKE, W. Bot. Zeitung Bd. 65 1907. Kleine Mitteilungen ueber Oxalsäurebildung in Pflanzen.
- 5 BIEDERMANN, W. Fermentforschung Bd. I 1916. Fermentstudien I. Die Autolyse der Stärke.
- 6 id. ibid. Fermentstudien 2. Die Autolyse der Stärke.
- 7 id. ibid. Bd. 1917 Fermentstudien 3. Pepsin und peptische Verdauung.
- 8 id. ibid. Bd. 1919. Fermentstudien 4. Zur Autolyse der Stärke.
- 9 id. ibid. Bd. 3 1920. Fermentstudien 5. Fermentbildung durch Ionenwirkung.
- 10 id. ibid. Bd. 3 1920. Bemerkung zu Wohlgemuths und Sallingers Einwände etc.
- 11 id. ibid. Bd. 4 1921. Fermentstudien 7. Die organischen Komponente der Diastasen und das wahre Wesen der Autolyse der Stärke.
- 12 id. Pflügers Archiv für die gesammte Physiologie Bd. 183 1920. Stärke, Stärkekörner und Stärkelösungen.
- 13 BOAS, F. Beih. zum Bot. Centralbl. Abt. 1 Bd. 36 1919. Unters. ueber Säurewirkung und Bildung löslicher Stärke bei Schimmelpilzen (*Asp. niger*) 1.
- 14 BOAS, F. und LEBERLE, H. Bioch. Zeitschr. Bd. 90 1918. Unters. ueber Säurebildung bei Pilzen und Hefen I.
- 15 id. ibid. Bd. 92 1918. id. II.
- 16 BOËSEKEN J. Beknopte scheikunde der suikers. Delft 1918.
- 17 BRENNER W. Centralbl. für Bakt. Parasitenkunde und Infektionskrankh. Bd. 40 1914. Die Stickstoffnahrung der Pflanzen.
- 18 BÜSGEN M. Ber. der Deutschen Bot. Ges. Bd. 3 1885. *Aspergillus Oryzae*.
- 19 BUTKEWITSCH, W. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 38 1902. Umwandlung

- der Eiweissstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhang mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung.
- 20 CLARK, W. M. and LUBS, A. H. Journ. of Bact. Vol. 2 1917. The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its application in bacteriology.
 - 21 COLIN, H. Hydrolyse de quelques polysaccharides par le *Botrytis cinerea*. Thèse de doctorat Paris 1911.
 - 22 DOX, A. W., U. S. Department of Agric. Bureau of animal Industry Bull. 120 Wash. 1910. The intracellular enzymes of *Penicillium* and *Aspergillus*.
 - 23 DUCLAUX, E. Traité de Microbiologie. T. II Paris 1899.
 - 24 EICHWALD, E. und FODOR, A. Die physikalisch-chemischen Grundlagen der Biologie. Berlin 1919.
 - 25 ELFVING, F. Öfersigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar Bd. 6 Afd. A N°. 15 1918—1919. Ueber die Bildung organischer Säuren durch *Aspergillus niger*.
 - 26 EULER, H. Chemie der Enzyme München-Wiesbaden 1920.
 - 27 FERMI, C. Centralbl. für Bakt. und Paras.kunde. Bd. 10 1891. Weitere Untersuchungen ueber die tryptischen Enzyme der Mikroorganismen.
 - 28 FERMI, C. und MONTESANO, G. Centralbl. für Bakt. und Paras.kunde. Abt. 2 Bd. 1 1895. Die von den Mikroben bedingte Inversion des Rohrzuckers.
 - 29 FERNBACH, A. Comptes rendus de l'Ac. des sc. T. 142 1906. Influence de la réaction du milieu sur l'activité des diastases.
 - 30 FISCHER, E. Ber. der Deutschen Chem. Ges. Bd. 27 III 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme.
 - 31 FUNKE, G. L. Zittingsverslag der Kon. Acad. van Wetensch. te Amsterdam. Deel 31 1922. De invloed van de waterstofionenconcentratie op de werking van de diastase van *Aspergillus niger*.
 - 32 GREZES, G. Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 26 1912. Recherches sur la sucrase de l'*Aspergillus niger*.
 - 33 KATZ J. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 31 1898. Die regulatorische Bildung von Diastase durch Pilze.
 - 34 KYLIN H. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 53 1911. Ueber Enzyymbildung und Enzymregulation bei einigen Schimmelpilzen.
 - 35 LAPPALAINEN H. Öfersigt af Finska Vetenskaps-Societetens Förhandlingar. Bd. LXII 1919—1920 Afd. A N°. 1. Biochemische Studien an *Aspergillus niger*. Akad. Abhandlung.
 - 36 LIPPMANN, O. v. Chemie der Zuckerarten. Braunschweig 1895.
 - 37 MICHAËLIS, L. Bioch. Zeitschr. Bd. 33 1911. Ueber die Dissoziation der amphoterer Electrolyte.

- 38 MICHAËLIS, L. und DAVIDSOHN, H. Bioch. Zeitschr. Bd. 35 1911. Die Wirkung der H⁺-Ionen auf das Invertin.
- 39 MICHAËLIS, L. und MENTEN. Miss M. L. Bioch. Zeitschr. Bd. 49 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung.
- 40 MICHAËLIS, L. und PECHSTEIN, H. Bioch. Zeitschr. Bd. 59. 1914. Die Wirkungsbedingungen der Speicheldiastase.
- 41 PEKELHARING, C. A. Rec. des trav. bot. néerl. Vol. 16 1919. Some remarks on enzymes.
- 42 PFEFFER, W. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 28 1895. Ueber Election organischer Nährstoffe.
- 43 POTTEVIN, H. Ann. de l'Inst. Pasteur. T. 27 1913. Influence de la configuration stéréo-chimique des glucosides sur l'activité des diastases hydrolytiques.
- 44 RAULIN, J. Etudes chimiques sur la végétation. Thèse de doctorat Paris 1870.
- 45 RINGER, W. E. en TRIGT, H. VAN. Onderz. physiol. lab. Utr. 5de reeks. Vol. 14 1913. Over den invloed van de reactie op de werking van ptyaline.
- 46 SCHIEMANN, E. Zeitschr. für ind. Abst.- und Vererb. lehre. Bd. 8 1912. Mutationen bei *Aspergillus niger* van Tieghem.
- 47 SÖRENSEN, S. P. L. Bioch. Zeitschr. Bd. 21 1909. Enzymstudien II.
- 48 WEHMER, C. Bot. Zeitung. Bd. 49 1891. Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze.
- 49 id. Ber. der Deutschen bot. Ges. Bd. 24 1906. Die Bildung freier Oxalsäure durch *Aspergillus niger*.
- 50 id. Bioch. Zeitschr. Bd. 59 1914. Der Gang der Acidität in Kulturen von *Aspergillus niger* bei wechselnder Stickstoffquelle.
- 51 WENT, F. A. F. C. Jahrb. für wiss. Bot. Bd. 36 1901. Ueber den Einfluss der Nahrung auf die Enzyymbildung durch *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc.
- 52 id. Zittingsverslag der Kon. Acad. van Wet. te Amst. Dl. 27 1918. De loop van de vorming van diastase van *Aspergillus niger*.
- 53 WESTERDIJK, JOH^a en LUYK, A. VAN. Meded. uit het phytopath. lab. „W. C. Scholethn“. Amst. Dl. 4 1920. Die Gloeosporien der Eiche und der Platane.
- 54 WOHLGEMUTH, J. Bioch. Zeitschr. Bd. 9 1908. Methode zur quantitativen Bestimmung der diastatischen Fermente.
- 55 WORTMANN, J. Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. 6 1882. Untersuchungen ueber das diastatische Ferment der Bakterien.
-



VIII. TABELLEN



TABEL 1A.

GG Glucose 5%.

dagen	diastase in het myc. ¹⁾	diastase in de cultuur- vloeistof ¹⁾	droogge- wicht in m.Gr.
2	2.7	8	71
3	2.5	10.5	92
4	75.-	190.-	315
5	40.-	300.-	357
6	35.-	180.-	524
7	15.-	20.-	615
9	16.5	0.75	818
11	23.-	0	981
13	10.-	0.9	993
16	30.-	0	865
19	50.-	2.5	939
23	68.-	12.3	714
26	10.-	20.9	724
30	33.-	31.5	671
33	9.1	92.5	656
37	60.-	454.5	
40	25.-	364	698
46	17.-		671

TABEL 1B.

ZG Glucose 5%.

diastase in het myc. ¹⁾	diastase in de cultuur- vloeistof ¹⁾	drooggew. in m.Gr.
3.5	4.5	67
3.8	4.-	112
11.5	12.5	264
8.5	13.5	399
6.-	5.5	571
3.5	0	885
15.-	0	1330
2.5	0.35	1125
9.-	0	1213
12.5	0	1200
8.1	0	956
6.-	0	886
7.5	1.-	851
9.4	2.9	889
8.6	2.3	841
10.7	16.4	779
11.7	160.-	807

¹⁾ de getallen in deze kolommen zijn alle gemiddelden van de resultaten van waarnemingen aan minstens twee culturen.

TABEL 2.

Glucose 4%.

dagen	draaing van de cultuur- vloeistof 10 c.M.	diastase in het myc.	PH van het myc.extract	diastase in decult.vl.st.	PH van de cult.vl.st.	droogge- wicht in m.Gr.
3	1° 47' 24"	7.5	5.8	10.-	5.9	
4	1° 40' 48"	10.-	5.25	33.3	3.8	112
5		68.-	4.25	70.-	3.6	291
6				75.5	2.6	510
7	1° 18' 0"			65.2	2.6	505
9				18.7	2.0	643
11	0° 37' 48"			93.5	2.0	804
13	0° 24' 0"			150.-	2.0	922
16	0° 11' 24"			2500.-	1.95	899
18	0° 9' 0"	375.-	3.1	2308.2	2.1	819
23				2000.-	4.2	763
26		428.-	3.2	3000.-	4.3	696
31		37.5	3.2	750.-	4.4	683
37		150	3.3	2500.-	4.2	580

TABEL 3.

Glucose 2.5%.

Dagen	draaing van de cult. vl. st. 10 c.m.	diast. in het myc. met water uitgetr.	Ph. van het myc. extract met water uitgetr.	diast. in het myc. met de cult. vl. st. uitgetr.	Ph. vh. myc. extract met cult. vl. st. uitgetr.	diastase in de cultuur vloeistof	Ph. van de cultuur vloeist.	droog gew. in m.gr.
3	1° 5' 24"			7.5	5.4	10.7	5.9	
4	1° 0' 0"	12.5	6.9	28.-	5.2	33.3	4.6	54
5		10.7	6.6	75.-	3.6	83.3	3.9	117
6		10.-	6.2	111.-	3.4	125.-	3.2	351
7	0° 43' 12"	13.7	6.25			176.5	3.-	359
9		14.4	6.05	100.-	4.2	68.2	2.05	435
11	0° 4' 12"	22.4	6.0			130.4	2.-	617
13	0° 0' 14"	16.7	6.1			167.-	1.95	614
16	0° 0' 0"	82.5	5.9			714.3	2.1	542
18		30.-	6.1	50.-	3.2	2308.2	2.9	543
23		12.-	6.0	882.	3.25	1071.-	3.2	481
25		57.7	6.2	250.-	3.4	1154.-	3.25	
26		—		428.-	3.2	1875.-	3.2	434
31		30.-	6.15	166.7	3.3	2308.4	3.2	472

TABEL 4.

Glucose 1%.

dagen.	draaing van de cult. vl.st. 10c.M.	diastase in het myc.	PH van het mycelium- extract	diastase in de cultuur- vloeistof	PH van de cultuur- vloeistof	droogge- wicht in m.Gr.
3	0° 25' 12"	27.8	5.45	5.-	6.6	38
4		166.7	5.1	200.-	3.55	107
5	0° 12' 0"	349.-	3.45	789.5	3.05	161
6		357.-	3.25	833.3	3.-	299
7				1071.4	3.—	234
9				2000.-	2.9	252
11	0°			3000.-	3.—	275
13	0° 0' 7"			2727.3	3.—	263
16				5454.5	3.05	254
18				6000.-	3.15	229
23				4286.-	3.55	238
26				4286.-	3.4	224
31		84.-	3.3	6000.-	3.5	254
37		18.5	3.4	6000.-	3.35	205

TABEL 5.

Zetmeel 2%.

dagen	diastase in het mycelium	PH van het mycelium- extract	diastase in de cultuur- vloeistof	PH van de cultuur- vloeistof	droogge- wicht in m.Gr.
3	4.6	7	0	6.5	135
5	0	4.8	2.-	5.1	201
7	6.4	4.6	457.1	3.4	248
8	10.-	4.65	333.3	3.1	
10	16.6	4.2	83.3	3.15	
11 X	12.5	4.0	8.2	2.4	499
18	9.7	4.0	10.-	2.05	486
22	5.4	3.95	18.7	2.4	495
25	5.-	3.9	30.-	2.1	417
29	3.-	4.1	833.3	3.1	380
32	3.3	4.0	1500.-	3.9	
36	3.5	4.2	1666.6	3.8	372
45	3.75	4.35	3000.-	3.85	

TABEL 6A. Zetmeel 0.5 % ZZ				TABEL 6B. Zetmeel 5 % GZ			TABEL 6C. Zetmeel 0.5 %	
dagen	diastase in het myc. ¹⁾	diast. in de cult. vl.st. ¹⁾	drooggewicht in m.Gr.	diastase in het myc. ¹⁾	diastase in de cult. vl.st. ¹⁾	drooggewicht in m.Gr.	diastase in de cult. vl.st. ¹⁾	Ph van de cult. vloeistof.
2	0	0	1	0	0	4		
3	2.-	3.5	26	3.75	0	9		
4	300.-	53.5	71	250.—	79	103		
5 × A	280.-	900.-	122	120.—	270	121	0	7
6 × B	560.-	900.-	122	220.—	320	104	5.4	6.6
7	140.-	2500.-	152	210.—	790	158	20.-	6.1
9 × C	33.-	3390	160	130.—	1000	191	166.7	4.6
10							300.-	4.05
11	20.-	6330.-	152	37.5	1760	172	357.1	3.8
13	12.-	5290	144	15.—	1680	170	1250.-	3.35
16	10.-	6260	129	25.—	1550	144	2500.-	3.1
19	8.6	4670	110	12.5	1450	139	2307.7	3.4
23	67.2	3960	111	30.—	1560	111		
26	17.8	4440	133	93.—	1077	137		
30	9.2	3780	141	23.6	1560	140		
32							1579	3.9
33	15.-	4090	130	13.6	1410	132		
40	104.2	4749	140	95.2	993.6	146		
46	14.6	5292	122	13.6	672.5	110		
52	10.-	4398		12.—	638.5	139		
58				21.4	675.3	147		

¹⁾ de getallen in deze kolommen zijn alle gemiddelden van de resultaten van waarnemingen aan minstens twee culturen.

TABEL 7.

Zetmeel 0.1% + glucose 4%

dagen	diastase in het mycelium met water uitge- trokken	diastase in het mycelium met de cult. vlst. uitgetrokken	diastase in de cultuurvloei- stof in kolf 1	diastase in de cultuur vloei- stof in kolf 2	gemiddelde van kolf 1 en 2	droog- gewicht in m.Gr.
2	8	7.5	6	7	6.5	91
3×	9.4	53.6	50	120	85	174
4×	30.-	53.6	214.5	333.3	273.9	390
5	33.3	42.8	33.3	333.3	183.3	403
7	15.-	15.-	4.2	4.2	4.2	775
9	115.-	75.-	3.-	0.6	1.8	913
11	50.-	55.-	1.5	2.5	2.-	908
13	67.-	16.6	1	3	2.-	885
16	48.-	20.-	1.5	4.2	2.9	775
19	42.9	37.5	1	1.-	1.-	793
23	33.3	100.-	4	4.5	4.3	621
26	23.-	33.3	20		20	
30	130.-	60.-	8.8	16.4	12.6	649
33	53.6	37.5	11.5	15	13.3	
37	6.8	44.1	78.9	30	54.5	576

TABEL 8.

Zetmeel 0.25 % + glucose 2.5 %.

dagen.	diastase in het myc. met water uit- getrokken.	diastase in het myc. met de cult. vl. st. uit- getrokken.	diastase in de cult. vl. st. in kolf 1.	diastase in de cult. vl. st. in kolf 2.	gemiddelde in kolf 1 en 2.	droog- gewicht in m. Gr.
2	4.9	15.—	0	0	0	56
3	21.4	158	130	88.2	109.1	152
4×	33.3	120	166.7	250.0	208.3	372
5	33.3	68.1	15	25	20	477
7	54.2	143	3	2.5	2.75	680
9	166.7	250	2	3	2.5	649
11	40.—	300	4.3	2	6.1	613
13	75.—	120	7.5	7.1	7.2	604
16	39.5	44.1	41.8	41.8	41.8	454
18	25.—	75	50		78.—	465
19				107		
21	28.8	50	142.8		142.8	
23	28.3	62.5	200.5	166.7	183.3	360
26	2.5	43	214.5		214.5	
30	3.4	85.7	250.—	250	250.—	447
33	7.5	40	428.6		428.6	
37	4.3	63.8	428.6	680.9	554.6	403

TABEL 9.

Zetmeel 0.4 % + glucose 1 %.

dagen.	diastase in het myce- lium met water uit- getrokken.	diastase in het myce- lium met cult. vl. st. uit- getrokken.	diastase in de cult. vl. st. in kolf 1.	diastase in de cult. vl. st. in kolf 2.	gemiddelde van kolf 1 en 2.	droog- gewicht in m.Gr.
2	3.5	15	0	0	0	47
3	5	58.2	107	65.2	86.1	93
4x	30	454.6	652	750	701	237
5	50	600	441	750	595.5	319
6	43.3	555.5	750		750	
7	47	555.5	375	714	544.5	378
9	176.4	625	1875	2145	2010	347
11	120	750	1500	1364	1432	355
13	45.4	200	1150	1150	1150	349
16	17.3	49	1250	1666	1458	295
18	39.5					
19		187.5	1580	1111	1346	278
21	32.-	57.7	1250		1250	
23	1	60	1500	2500	2000	292
26	3.9	34	833.3		833.3	
30	11.1	39.5	1875	1363	1614	279
33	4.3	40	967.7		967.7	
37	7.4		1000	935	976.5	307

TABEL 10.

Maltose 5 %.

dagen.	draaiing van de cult. vl. st. 10 c.m.	diastase in het myc.	P _H van het myc. extrast.	diastase in de cult. vl. st.	P _H van de cult. vloeistof.	droog- gewicht in m.Gr.
3	5° 29' 6"	spoor	7	spoor	6.43	
4	5° 41' 6"	4.4	6.83	2.5	6.3	
5	5° 9' 0"	0	4.5	93.5	4.5	240
6	4° 38' 12"	spoor	3.1	333.3	2.75	410
7	—	25	2.9	157.9	2.06	580
9	2° 53' 31"	36.3	2.25	8.3	1.85	856
11	2° 3' 36"	37.5	2.1	30.—	1.80	1041
13	2° 10' 24"	11.5	2.—	10.—	1.80	1040
16	1° 45' 34"	18.7	1.9	15.—	1.95	996
19	1° 33' 36"	18.7	2.1	16.7	1.9	924
24	1° 23' 24"	39.5	2.05	57.8	1.95	911
31	0° 34' 21"			50.—	2.—	853

TABEL 11A.

Saccharose 5 %.

GS

dagen.	draaing van de cultuur- vloeistof 10 c.M.	diastase in het mycemextr.	pH van het myc. extract.	diastase in de cult.vl.st.	pH van de cult.vl.st.	drooggewicht in m. Gr.
2	+3° 6'20"			18.7	7	1
3	+3°65' 3"	7.-	6	11.3	6.2	120
4	+1°32'14"	8.8	6.8	12.9	6.0	179
5	+0° 6' 5"	1.4	6.1	1.3	5.2	248
6	-0°38'22"	0.5	5.9	4.7	4.1	376
7	-1°43'12"	1.4	5.1	5	4.0	394
9	-1°29'36"	0	4.2	0	2.8	613
11	-1°21'52"	2.1	3.9	1.5	3.0	614
13	-1°19'41"	21.5	3.3	0	2.6	587
14		25.-	3.1	0	2.1	
16	-1°12'24"	11.5	2.6	0	1.95	746
17		27.3	2.3	0	1.8	
18	-1°43'12"	29.5	2.7	0	1.85	
19	-1°10'28"	21.5	2.2	0	1.9	
20		27.3	2.0	0	2.1	817
21	-1° 0'19"	34.-	2.4	0	2.2	
24	-0°33' 8"	25.-	2.6	0	2.1	884
26	0° 0' 0"	28.7	2.6	0	2.4	
28	—	15.-	2.7	0	2.7	1100
30	—	18.7	3.1	0	2.2	
33	—	23.-	2.8	0	2.15	1040
37	—	25.-	2.9	0.5	2.4	1034

TABEL 11B.

Saccharose 5 %.

SS

draaing van de cultuur- vloeistof 10 c.M.	diastase in het mycelium	pH van het myc. extract.	diastase in de cult.vl.st.	pH van de cult.vl.st.	drooggewicht in m.Gr.
+3°15'35"	0	6.8	4.5	6.7	
+0°43'20"	0	5.4	1.5	4.8	148
	1	4.5	2.5	3.9	
-1°38'42"	1.2	3.1	1	2.9	688
-1° 0'36"	7.5	1.95	0	2.1	916
-0°32'22"	18.-	2.35	0	2.0	1062
0° 0' 0"	7.5	2.2	0	2.3	601?
—	7.1	2.3	0	2.2	850
—	3.7	2.7	0	2.55	
—	15.-	2.3	0	2.35	903

TABEL 12A.

Saccharose 5 % + Fe^{..} + Z^{..}
GS'

dagen	draaing van de cult. vl. st. 10 c.M.	diastase in het myc.	P _H van het myc. extract	diastase in de cult. vl. st.	P _H van de cult. vl. st.	drooggewicht in m.Gr.
3	+2°45'17"	6.5	6.8	12.5	6.8	118
4		9.5	5.9	9.8	5.8	182
5	+0° 0'22"	7.4	5.1	6.9	4.95	361
6		5.-	4.2	3.1	3.6	555
7		5.-	3.4	1.1	3.1	752
9		2.5	3.05	0	2.2	1115
11	-1°50'46"	46.8	2.45	0	2.1	1440
13		23.1	2.0	0	1.85	1370
14		32	1.95	0	1.8	
16		42.8	1.8	0	1.95	1469
17		45.5	1.85	0	1.8	
18	-1°12'28"	26.-	2.1	0	1.90	
19		45.5	2.0	0	2.05	
20		50.-	2.15	0	1.95	1203
21	-0°32'10"	42.8	2.2	0	2.1	
24	0° 0' 0"	21.4	2.4	1.5	2.2	1194
28		10.-	2.1	0	2.3	1057
33		10.7	2.6	0	2.05	1042
37		9.5	2.6	1.4	2.3	1034
44		5.-	2.55	11.5	2.2	

TABEL 12B.

Sacch. 5 % + Fe^{..} + Z^{..}
SS'

draaing van de cult. vl. st. 10 c.M.	diastase in het myc.	diastase in de cult. vl. st.	drooggewicht in m.Gr.
+2°48'44"	1.8	0.5	
+0°32'22"	0	1.-	183
-0°16'24"	4.6	8.1	
-0°32'24"	15.-	0	1464
0° 0' 0"	9.6	0	1389
—			
—			
	7.5	1.2	1177
	12.-	4.4	1120
	6.9	2.9	1099
	3.3	21.4	
	5.-	0	1103

TABEL 13A.

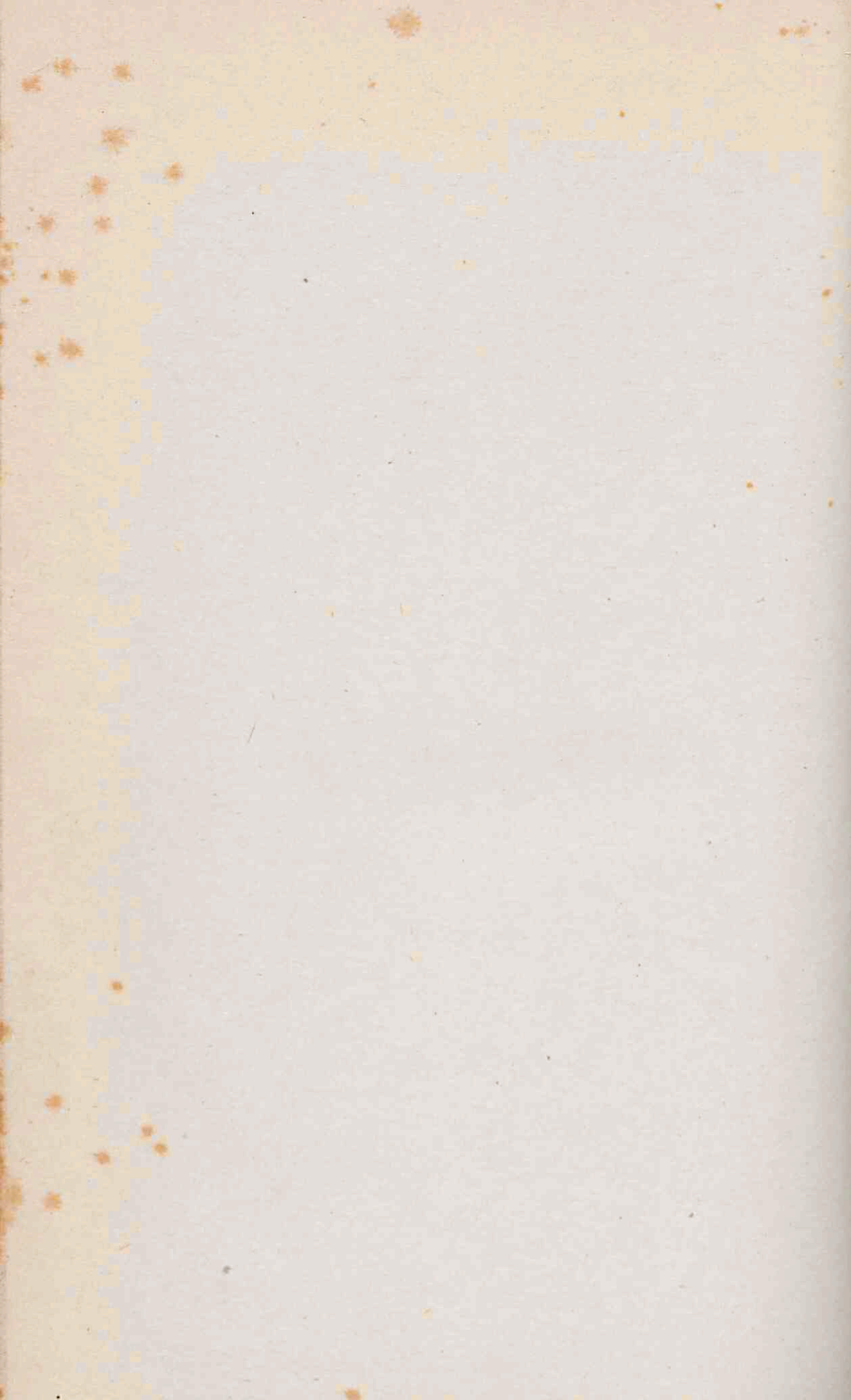
Glycerine 5 %

dagen.	diastase in het mycelium	P _H van het myc. extract	diastase in de cult. vl. st.	P _H van de cult. vl. st.	drooggewicht in m.Gr.
2			11.-	6.6	1
3			8.2	6.1	23
4			9.-	6.0	111
5	1.6	6.8	1.6	5.8	97
6	0.5	6.1	0.5	5.45	128
7	1.2	5.95	2.4	5.1	127
9	0	5.8	0	4.8	140
11	0	5.3	0	4.8	176
13	0	5.0	0	4.7	167
16	5	4.7	5.-	4.3	476
18	4.9	4.2	1.1	3.8	
19	4.3	3.9	4.3	3.1	
20	10.-	3.1	1.4	2.75	610
21	4.7	2.4	6	2.46	
24	3	2.35	0	2.05	572
28	4.7	2.2	1.4	1.90	1052
30	13.6	1.95	0	2.05	
33	5	2.3	1.3	1.95	990
37	5	2.1	0	2.2	943
44	2.5	2.4	0	2.72	
52	5.4	2.7	0	2.35	

TABEL 13B.

Glycerine 5%

diastase in het mycelium	diastase in de cultuur vl. st.	drooggewicht in m.Gr.
0	0	
	0	48
0	0	
0.2	0.7	134
1.7	4	676
5.-	0	685
4.7	0	504
4.4	0	998
7.5	0	
7.5	0	882



STELLINGEN

I

Levend protoplasma van Thallophyta is doorlaatbaar voor enzymen.

II

De erfelijkheid van modificaties is een der hoofdfactoren in de evolutie.

III

Een soortskenmerk mag slechts bepaald worden door quantitatieve gegevens; ook dan nog is het gewenscht, het als een hypothetisch begrip te beschouwen.

IV

De onderzoekingen van de Mol over de heteroploidie bij *Hyacinthus orientalis* steunen de theorie, die de chromosomen beschouwt als dragers van de erfelijke eigenschappen (Morgan).

V

Spermatophyta zijn niet uit Pteridophyta, doch zelfstandig ontstaan.

VI

Bij het beoordeelen van biologische rassen van schimmels is nooit genoeg rekening gehouden met den invloed, dien de voedsterplant als voedingsbodem uitoefent.

VII

Bij de Vertebrata bestaat geen principieel verschil tusschen somatische- en geslachtscellen.

VIII

Terecht beschouwt Cohn de scolex der Cestoden als het achtereinde van het lichaam.

IX

De bewijzen, die Driesch geeft voor de autonomie van het leven, zijn niet afdoende.

X

Ondanks de wijzigingen in het leer- en eind-examenprogramma, in de laatste jaren aangebracht, geeft het gymnasium nog altijd de beste vooropleiding voor de(n) bioloog.

XI

De regeling, vastgesteld bij het Academisch Statuut van 17 Juni 1921 (Staatsblad N^o. 800), die de mogelijkheid openlaat van twee verschillende examens, die toegang geven tot de studie voor het doctoraal examen in de plant- en dierkunde, is af te keuren.

K11551-E

