



De kleurstoffen van *Neurospora (Monilia) sitophila* Shear et Dodge

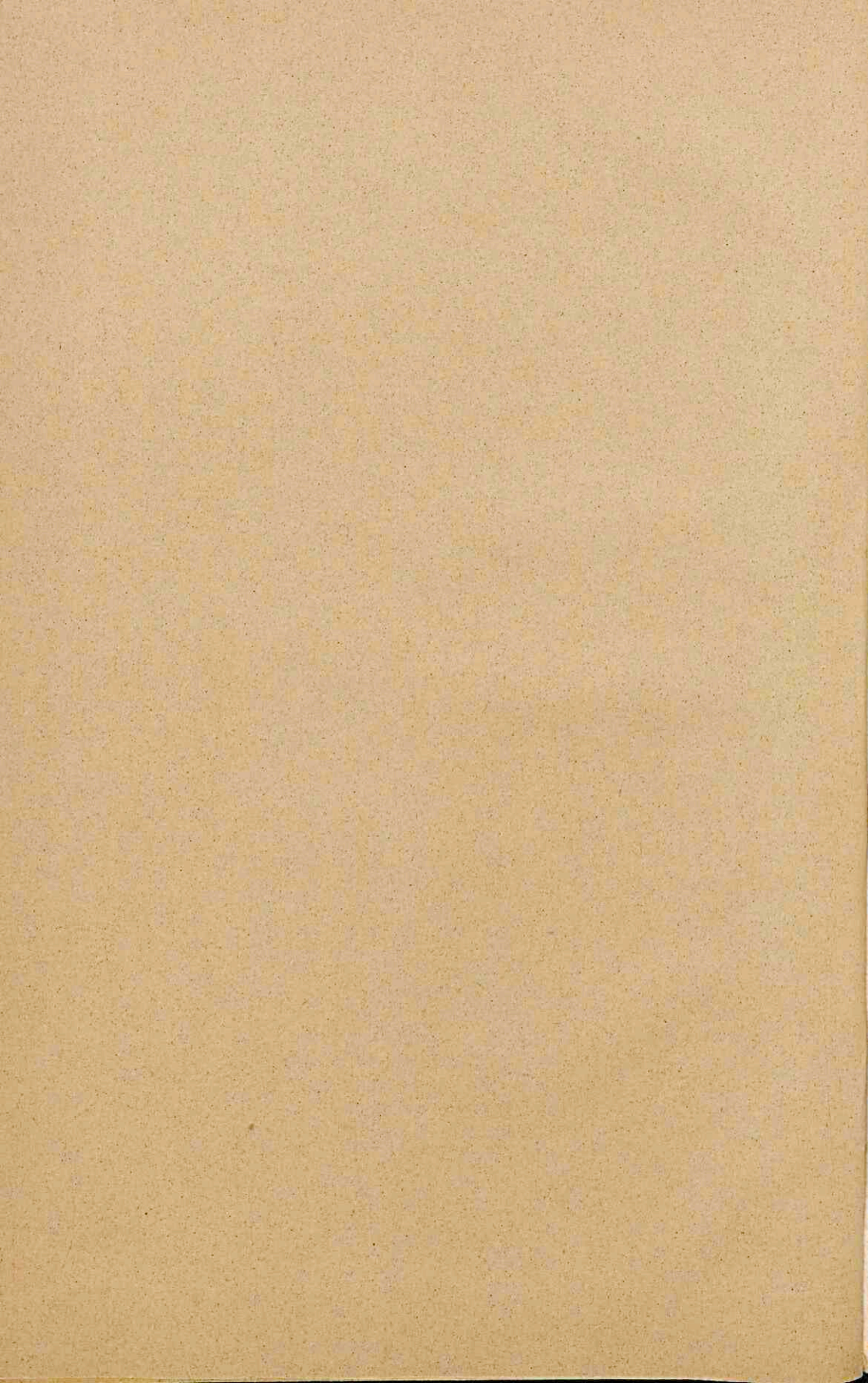
<https://hdl.handle.net/1874/296168>

24. dec. 192. 1930.

De kleurstoffen van *Neurospora*
(*Monilia*) *sitophila* Shear et Dodge

W. F. VAN DEVENTER

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.



DE KLEURSTOFFEN VAN NEUROSPORA
(MONILIA) SITOPHILA SHEAR ET DODGE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
PRESS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
PRESS

De kleurstoffen van *Neurospora* (*Monilia*) *sitophila* Shear et Dodge

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS JHR. DR. B. C. DE SAVORNIN LOHMAN, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 10 NOVEMBER 1930 DES NAMIDDAGS TE VIER UUR DOOR

WILHELMINA FREDERIKA VAN DEVENTER,
GEBOREN TE 'S-GRAVENHAGE.

□ □ □

KEMINK EN ZOON N.V. - OVER DEN DOM - UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUMIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN MOEDER

VOORWOORD

Bij de voltooiing van dit proefschrift wil ik gaarne van de gelegenheid gebruik maken, een woord van dank te richten tot allen, die invloed op mijn wetenschappelijke opleiding uitoefenden.

In de eerste plaats tot U, Hooggeleerden Went, hooggeachten promotor. Nooit genoeg zal ik het kunnen waardeeren, dat ik mijn proefschrift onder Uw leiding heb mogen bewerken. Uw warme belangstelling in mijn werk is voor mij van groote beteekenis geweest. Niet minder ben ik Mevrouw Went en U erkentelijk voor de groote hartelijkheid en gastvrijheid, die gij mij bewezen hebt.

Hooggeleerde Westerdijk, Uw colleges en practica zijn voor mij van groote waarde geweest. Tevens heb ik het zeer op prijs gesteld, dat ik assistente bij U heb mogen zijn. Ik dank U voor alles, wat gij gedurende deze jaren voor mij geweest zijt.

U, Hooggeleerden Pulle en Nierstrasz, dank ik voor wat gij hebt bijgedragen tot mijn wetenschappelijke vorming.

Zeer erkentelijk ben ik U, Hooggeleerden Jordan, van Romburgh, Kruyt en Moll voor het onderwijs in mijn eerste studie jaren.

Zeer gewaardeerd heb ik het, Hooggeleerde BaasBecking, dat ik bij den aanvang van mijn onderzoek vele goede raadgevingen van U heb mogen ontvangen.

Bij de bewerking van mijn dissertatie heb ik veel hulp mogen ondervinden in het Fysisch Laboratorium te Utrecht en in het Laboratorium voor Technische Botanie te Delft, waarvoor ik U, Hooggeleerden Ornstein en van Iterson, veel dank zeg. Ook de assistenten in bovengenoemde labo-

ratoria zijn mij zeer behulpzaam geweest. Geachte Vermeulen, zonder Uw hulp zou het mij niet mogelijk zijn geweest het physische deel van dit proefschrift te bewerken. De groote bereidwilligheid, waarmee gij mij steeds behulpzaam zijt geweest, heb ik zeer op prijs gesteld. Ook U, geachten Eilers, ben ik voor Uw nuttige wenken en hulp zeer erkentelijk.

U, Zeergeleerden Nuernbergk, ben ik zeer verplicht door Uw hulp en het gebruik van Uw toestel.

Zeer dankbaar ben ik ook Jet Koning, die mij vele malen behulpzaam is geweest.

Verder wil ik woorden van dank richten tot het geheele personeel van het Botanisch Laboratorium; in het bijzonder dank ik U, waarden A. de Bouter, voor de zorg door U aan de teekeningen besteed.

INHOUD.

	Blz.
HOOFDSTUK I. Inleiding	1
HOOFDSTUK II. Methode	4
§ 1. Materiaal	4
§ 2. Voedingsbodems	4
§ 3. De invloed van de koolhydraatconcentraties op de vorming van het luchtmycelium en de kleur- stof	6
§ 4. Kweekwijze	8
§ 5. Prepareeren van het materiaal	10
HOOFDSTUK III. De schimmelkleurstoffen	13
§ 1. Microchemisch aantoonen van de kleurstof . .	13
§ 2. Oplosbaarheidseigenschappen van de kleurstof	13
§ 3. Het extraheeren van het schimmelpoeder . .	14
§ 4. Capillairanalyse van Goppelsroeder	15
§ 5. De chromatografische analyse van Tswett . .	17
§ 6. Methodiek van de chromatografische analyse van Tswett	18
§ 7. Toepassing van de chromatografische ana- lyse op de schimmelkleurstoffen	20
§ 8. Is er nog een derde kleurstof aanwezig . . .	23
§ 9. De uitschudmethode	26
§ 10. Het uitkristalliseeren van carotinoïden . . .	28
§ 11. Intensiteitsbepaling van de kleurstoffen met de colorimeter	30

	Blz.
HOOFDSTUK IV. Bepaling van de absorptiespectra.	34
§ 1. Qualitatieve bepaling van de absorptiespectra met de spectograaf	34
§ 2. Quantitatieve bepaling van de absorptiespectra met den monochromator	37
HOOFDSTUK V. De invloed van lucht op de vorming van de kleurstoffen en van de conidiën . .	54
§ 1. De invloed van den luchttoevoer op de kleurstofvorming	
§ 2. De invloed van verschillende gassen op de kleurstofvorming	56
§ 3. De invloed van lucht op de conidiënvorming .	62
HOOFDSTUK VI. De invloed van licht op de kleurstofvorming	65
§ 1. De invloed van diffuus daglicht op de vorming van de kleurstoffen	65
§ 2. Belichting van de schimmel met een electriche lichtbron	66
§ 3. <i>De invloed van continue belichting met een electriche lichtbron op de kleurstofvorming .</i>	70
§ 4. De invloed van intermitteerende belichting met een electriche lichtbron op de kleurstofvorming	72
§ 5. De vorming van de kleurstoffen bij licht van verschillende golflengten	74
Samenvatting	80
Literatuur	83

HOOFDSTUK I.

Inleiding.

Het oorspronkelijke doel van dit onderzoek was het verband na te gaan tusschen de hoeveelheid licht en de hoeveelheid gevormde kleurstof in *Monilia sitophila* (M o n t.) S a c c.

In de publicaties van W e n t (1901 b, 1904) wordt vermeld, dat *Monilia sitophila* in het donker gekweekt kleurloos is, terwijl de schimmel in het licht een oranje kleurstof vormt. Het bleek, dat een cultuur van de schimmel, die in het donker gegroeid was, zich in diffuus daglicht na 3 of 4 uur rose kleurde, langzamerhand donkerder werd en tenslotte in intensief oranje overging. Voor de vorming van de kleurstof is de inwerking van het licht op de schimmel absoluut noodzakelijk en wel alleen dat deel van het licht, dat de stralen met kleine golflengten bevat; rood, geel en oranje licht hebben geen invloed. Dit laatste werd waargenomen met klokken van S a c h s, waarin zich vloeistoffen bevonden, die verschillende deelen van het spectrum absorbeerden.

De kleurstofvorming geschiedt langzamerhand, eenigen tijd na het ophouden van de belichting wordt ze eerst zichtbaar. Een korte belichting, 15 min. inwerking van diffuus daglicht, is reeds voldoende om zichtbare kleurstofvorming te verkrijgen; bij een langere belichting hoopt zich de werking op en wordt er meer en meer kleurstof gevormd. Verdere photometrische onderzoekingen werden niet gedaan, daar een nauwkeurige bepaling van de kleurstof niet mogelijk was.

Het pigment, waardoor de schimmel oranje gekleurd wordt, zou carotine zijn, wat met de kalimethode van Molisch (1896) aangetoond werd. De met deze methode verkregen kristallen gaven de microchemische carotine reacties. Ook wat zijn oplosbaarheid betrof, gedroeg het pigment zich als carotine. Daar uit de schimmel geen zuivere carotine-oplossing verkregen werd, kon spectroscopisch slechts vastgesteld worden, dat de kleurstof-oplossing een absorptieband bezit, die het geheele blauwe en violette deel van het spectrum omvat, ongeveer van λ 0.5 af.

Moeilijk kon vastgesteld worden, hoe de carotine in het cytoplasma verdeeld voorkomt. Het maakte den indruk als zou de kleurstof in zeer fijne druppeltjes (misschien in een vet opgelost) aanwezig zijn.

Deze veronderstelling is door latere onderzoekingen over het voorkomen van carotine in de cel zeer aannemelijk geworden. Men heeft n.l. gevonden, dat carotine en daarmee verwante pigmenten heel vaak in cellen voorkomen, waarin lipoiden aanwezig zijn. Men heeft daarom aan die pigmenten den gezamenlijken naam van vetkleurstoffen of, zooals Czapek (1913) heeft voorgesteld, van chromolipoiden gegeven. Tswett (1911) noemde die chromolipoiden, die chemisch nauw verwant zijn met carotine, carotinoïden. Czapek (1922) wijst er op, dat de groote meerderheid van de oranje-geel en rood gekleurde schimmels kleurstoffen schijnt te bevatten uit de groep van de chromolipoiden, maar dat deze nog nooit precies bepaald zijn. Zelfs moet nog vastgesteld worden of *Daucuscarotine* wel bij schimmels voorkomt.

Door deze opmerking van Czapek leek het mij niet overbodig, voordat ik mij met het eigenlijke onderzoek zou gaan bezig houden, eerst nauwkeurig de chemische en physische eigenschappen van de schimmelkleurstof vast te

stellen en te vergelijken met Daucuscarotine, wat beschreven is in hoofdstuk III en IV.

Bij het herhaaldelijk kweken van de schimmel merkte ik op, dat luchttoevoer van belang is voor de vorming van de kleurstof en de conidiën. Dit heeft geleid tot de proeven vermeld in hoofdstuk V.

In hoofdstuk VI heb ik, behalve het verband van de hoeveelheid licht en de hoeveelheid gevormde kleurstof, ook nog besproken hoe met een nauwkeurige methode nagegaan is, bij welke golflengten van het licht kleurstofvorming mogelijk is.

HOOFDSTUK II.

Methode.

§ 1. Materiaal.

Voor het onderzoek werd een stam van *Monilia sitophila*, afkomstig van het „Centraal Bureau voor Schimmelcultures” te Baarn, Holland, gebruikt.

Monilia is een zeer gemakkelijk groeiende schimmel, die, in cultuurbuizen met een gunstigen voedingsbodem, rijkelijk oranje conidiën vormt. In oudere cultures vormen zich steriele peritheciën, in hun aanvangsstadium beschreven door Went (1901a), maar daar ze niet tot verdere ontwikkeling kwamen, was het niet mogelijk de schimmel de werkelijke plaats in het systeem te geven. Shear en Dodge (1927) gelukte het rijpe peritheciën te verkrijgen. Het ascosporenstadium van *Monilia sitophila* behoort tot de *Pyrenomyceten* en de schimmel wordt nu tot een nieuw geslacht *Neurospora* gerekend. Uit het onderzoek van Shear en Dodge is gebleken, dat *N. sitophila* heterothallisch is, éénsporecultures geven steeds alleen het conidiënstadium.

Van nu af zal ik in den tekst de schimmel niet meer *Monilia*, maar *Neurospora* noemen.

§ 2. Voedingsbodems.

Als men den invloed van verschillende uitwendige omstandigheden op de kleurstofvorming na wil gaan, moet men de schimmel kweken onder zoo gunstig mogelijke voedingsvoorwaarden. Over het algemeen voldoen de natuur-

lijke voedingsbodems beter dan de synthetische, maar deze laatste hebben het groote voordeel, dat men precies de samenstelling hiervan kent. Verder is het de vraag wat beter geschikt is, vaste of vloeibare voedingsbodems. Synthetische agarbodems werden het eerst geprobeerd.

Went (1901a) vond, dat maltose, zetmeel of technische glucose goede koolhydraten voor *Neurospora sitophila* zijn. Bij alle drie waren als voedingszouten toegevoegd 0,5 % KNO_3 , 0,1 % KH_2PO_4 , en 0,05 % MgSO_4 . Inderdaad bleek, dat de groei op deze drie agarbodems in glazen cultuurdoozen, beschreven in § 4, vrij goed was. De schimmel vormde op den vasten bodem een vrij dikke myceliumlaag, luchtmycelium was slechts weinig aanwezig. Om het myceliumdek geheel vrij van den voedingsbodem te krijgen, bleek het noodig dezen laatste te koken. Hierdoor is het gebruik van vaste voedingsbodems onmogelijk, daar de schimmelkleurstoffen, die tot de carotinoïden behooren, niet aan hooge temperatuur blootgesteld mogen worden, waarop door Escher (1909) gewezen werd. Escher kreeg n.l. de beste en zuiverste carotine-opbrengst uit *Daucus carota*, als de wortelen niet van te voren gekookt waren, wat vroegere onderzoekers wel steeds gedaan hadden.

Ook natuurlijke voedingsbodems, als gestoomde rijst, wortelen en brood, zijn ongeschikt; het mycelium groeide hier geheel om- en doorheen en was er niet vrij van te krijgen.

De drie bovengenoemde koolhydraatbodems werden nu zonder toevoeging van agar, dus als vloeibare voedingsbodem geprobeerd. De schimmel groeide over de oplossing naar de opstaande kanten van de doozen en vormde daar wat luchtmycelium. Het schimmeldek vormde veel minder kleurstof dan het luchtmycelium, wat aan zuurstofgebrek te wijten is (zie hoofdstuk V). Voor mijn verdere proeven was het dus noodzakelijk, dat ik uitsluitend luchtmycelium gebruikte. In bovengenoemde cultures was het gevormde

luchtmycelium te gering om mee verder te werken. Daar W e n t (1901 b) vermeldt, dat de oogst van *N. sitophila* met de concentratie van de koolhydraten stijgt, leek het mij heel goed mogelijk, dat ook de hoeveelheid luchtmycelium zou toenemen met de koolhydraatconcentratie.

Bovendien vond ik in de literatuur eenige opgaven, die er op wijzen, dat ook de kleurstofvorming hierdoor beïnvloed wordt. Nader onderzocht moest dus ook worden, of bij een bepaalde koolhydraatconcentratie een optimale pigmentvorming plaats heeft.

§ 3. De invloed van de koolhydraatconcentraties op de vorming van het luchtmycelium en de kleurstof.

L i p p m a a (1925) ging de rhodoxanthinevorming na in geïsoleerde bladfragmenten van *Reseda odorata* op saccharose-oplossingen en vond, dat bij grootere suikerconcentraties dit carotinoïde sneller gevormd wordt; een optimale concentratie werd niet gevonden. Te hoge concentraties veroorzaakten het afsterven van de bladfragmenten, zonder dat zich rhodoxanthine gevormd had. C h o d a t e n M a y e r (1927) werkten over de carotinevorming bij eenige algen. Deze onderzoekers constateerden verhoogde kleurstofvorming bij toenemende suikerconcentratie.

Ook voor niet-carotinoïden werd waargenomen, dat de kleurstofvorming soms beïnvloed wordt door concentratieverschillen van de koolhydraatvoeding, o.a. vond N a u m a n n (1912), dat voor *Epicoccum purpurascens* het optimum van de pigmentvorming bij een 5—10 % glucose-oplossing ligt. Bij een concentratie van 50—60 % glucose groeide de schimmel nog wel, maar de kleurstofvorming bleef geheel uit. Dat bij dit hoge glucosegehalte geen kleurstof gevormd werd, wordt aan den hoogen osmotischen druk toegeschreven. In het onderzoek door H i b i n o (1925) over *Monascus purpureus* wordt vermeld, dat be-

halve voor saccharose, de kleurstofvorming ongeveer evenredig is met de koolhydraatconcentraties.

Om na te kunnen gaan, of ook bij *Neurospora* de vorming van de pigmenten en het luchtmycelium door de koolhydraatconcentraties beïnvloed wordt, werden eenige reeksen van cultures gemaakt. Voor deze cultures werd een voedingsbodem gebruikt, die als zouten 0,3 % KNO_3 , 0,05 % KH_2PO_4 en 0,01 % MgSO_4 bevatte. N a u m a n n (1912) kreeg in deze verhouding de beste pigmentvorming bij *E p i c o c c u m*. Van deze vloeistof werd in ieder van de glazen cultuurdoozen 20 c.c. gebracht en hieraan de verschillende hoeveelheden glucose of maltose toegevoegd. De volgende percentages werden gebruikt:

% glucose 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50.

% maltose 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70.

In de oplossing met maltose groeit de schimmel sneller dan in die met glucose. Het meeste luchtmycelium wordt gevormd in de oplossing met 5—10 % glucose of 20—30 % maltose. Bij hogere concentraties neemt de hoeveelheid luchtmycelium af, de groei wordt minder, om in een oplossing met 40 % glucose of met 70 % maltose geheel op te houden. Dit ophouden van den groei is naar alle waarschijnlijkheid terug te brengen op den hoogen osmotischen druk. Voegt men n.l. bij een 5 % glucoseoplossing zooveel NaCl toe, dat deze oplossing isotonisch is met de 40 % glucoseoplossing dan treedt geen groei op.

Na gelijke belichting vertoonden de schimmelcultures in de voedingsbodems met de verschillende glucose- of maltoseconcentraties geen uiteenlopende verschillen in kleurstofvorming. Van een optimale kleurstofvorming was in ieder geval geen sprake. Zooals mij uit latere proeven bleek, wordt de eenigszins ongelijke kleurstofvorming hoogstwaarschijnlijk niet veroorzaakt door de concentratieverschillen van de koolhydraten. In hoofdstuk VI zal ik er op wijzen, dat schimmelcultures, die onder dezelfde omstandigheden

gegroeid zijn, na gelijke belichting dikwijls verschil in kleurstofvorming vertoonen.

Het zou dus alleen mogelijk zijn uit te maken, of de kleurstofvorming beïnvloed wordt door concentratieverschillen van de koolhydraten als bij hogere concentraties de kleurstofvorming geheel of nagenoeg geheel ophoudt. Een uitblijven van de pigmentvorming werd echter niet waargenomen. Bij de hogere suikerconcentraties was de schimmelgroei zeer gering, slechts een gedeelte van de voedingsoplossing werd overgroeid; geen luchtmycelium werd gevormd, direct op het schimmeldek bevonden zich conidiën.

§ 4. Kweekwijze.

Ondanks de voordeelen, die het gebruik van synthetische voedingsbodems biedt, ben ik tenslotte voor mijn verdere proeven toch overgegaan tot het gebruik van een natuurlijke bodem. Het bleek mij, dat *N. sitophila* in vloeibare mout veel meer luchtmycelium vormt dan in suikeroplossingen met de meest gunstige koolhydraatconcentraties. Daar het voor mijn onderzoek van veel belang was zooveel mogelijk luchtmycelium te verkrijgen, werd de schimmel steeds in vloeibare mout gekweekt. Om zeker te zijn steeds met denzelfden bodem te werken, kreeg ik de beschikking over een groote hoeveelheid mout, afkomstig van de bierbrouwerij „d'Oranjeboom” te Rotterdam, voldoende voor mijn geheele onderzoek. De verkregen mout werd steeds met dezelfde hoeveelheid water verdund. Zooals uit de vorige § gebleken is, oefenen concentratieverschillen van de koolhydraten geen invloed uit op de kleurstofvorming. Bij het gebruik van de vloeibare mout heeft men dus alleen zorg te dragen niet met een te geconcentreerde oplossing te werken, daar anders conidiënvorming optreedt. Het beste is

enkele verdunningen te maken en dan te bepalen bij welke verdunning de meeste luchtmyceliumgroei optreedt.

Voor mijn proeven werden steeds glazen cultuurdoozen met een diameter van 10 c.M. en een hoogte van 6 c.M. gebruikt. Het deksel was van spiegelglas en paste goed sluitend met ingeslepen rand op de doos. Neemt men doozen met deksels met overhangenden rand, die slecht sluiten, dan heeft er door den te vrijen luchttoevoer conidiënvorming plaats, wat voor de belichtingsproeven vermeden moet worden. Hierop zal ik in hoofdstuk V nog terug komen.

Na afzonderlijk steriliseeren van de doozen en de voedingsoplossing, moet eenzelfde hoeveelheid van deze laatste in de doozen gebracht worden. Op een eenvoudige manier kan dit geschieden met een scheitrechter, waaruit men een bepaald vol. mout af kan laten loopen. Den scheitrechter maakt men steriel door dezen goed met een alcohol-sublimaatoplossing te schudden en daarna flink met gesteriliseerd water na te spoelen. In elke doos werd op deze wijze 20 c.c. voedingsoplossing gebracht.

Voor de latere belichtingsproeven is het van belang, dat de schimmel zoo gelijkmatig mogelijk tegen de opstaande kanten groeit. Daarvoor is het noodig, dat de doozen na het enten niet meer verplaatst worden, daar anders allicht het entstukje verschuift en men daardoor een onregelmatigen groei van het luchtmycelium krijgt. Daarom plaatste ik de glazen doozen voor het enten in een kist, die ik geheel van het licht kon afsluiten. Uit eenzelfde doos, waarin in het donker kleurloos mycelium gegroeid was, entte ik in het midden van elke doos ongeveer even groote stukjes mycelium. Het hangt nu van de temperatuur af hoelang men de cultures moet laten groeien. Om ze voor de verdere proeven te kunnen gebruiken, moesten ze zoolang groeien, tot het luchtmycelium het deksel bereikt had. Ik beschikte niet over zulk een groote thermostaat, dat deze alle doozen be-

vatten kon, zoodat de schimmels niet bij constante temperatuur groeiden.

Afhankelijk van een gemiddelde hogere of lagere temperatuur had de schimmel vroeger of later het deksel van de doos bereikt. Bevonden zich de cultures in een kweekkasje met dagtemperatuur van 26—28° C., een nachttemperatuur van 22° C., dan was na 5 dagen het deksel bereikt. Later bevonden de schimmels zich echter op een tafel van de laboratoriumzaal voor de centrale verwarming geplaatst, waar de dagtemperatuur 22° C., de nachttemperatuur 19° C. was; dan waren ze eerst na 6½ dag geschikt voor het gebruik.

§ 5. Prepareeren van het materiaal.

Het mycelium, dat in de doozen gegroeid is en dat aan verschillende uitwendige omstandigheden blootgesteld is geweest, moet nu geoogst worden, om dan de kleurstoffen, die zich in de schimmel gevormd hebben, nader te kunnen onderzoeken.

Daar de schimmel gevoelig voor licht is, is het dus noodzakelijk als men over lichtinvloeden werkt, de schimmel bij rood licht te oogsten, daar ik gevonden heb, dat in dat deel van het spectrum geen kleurstofvorming plaats heeft (zie hoofdstuk VI).

Met een spatel kan men heel gemakkelijk het myceliumdek, dat over de vloeibare mout gegroeid is, losstooten van het luchtmycelium en dan dit laatste van den opstaanden kant van de doos afschuiven. Het myceliumdek is na afspoelen met water heel goed vrij van mout te krijgen. Voor vergelijkingsproeven over de kleurstofvorming is het echter niet te gebruiken, daar alleen de allerbovenste laag kleurstof vormt, wat ik reeds in § 2 vermeldde.

Door Willstätter en Stoll (1913) wordt aangegeven, dat het luchtmycelium zoo snel mogelijk gedroogd moet worden, daar bij langzaam drogen kleurstof verloren

gaat. Eerst wordt het mycelium goed uitgeperst tusschen filtreerpapier en daarna gebracht in een droogstoofje onder afsluiting van licht, bij een temperatuur niet hooger dan 40° C. Door Goerrig (1918) wordt er nadrukkelijk op gewezen, dat hooge temperatuur en direct licht bij het drogen vermeden moeten worden. De carotinoïden worden omgezet onder invloed van warmte en licht.

Na 8 uur is het mycelium voldoende gedroogd om gepoederd te kunnen worden in een mortier, die vooral van binnen niet geglazuurd mag zijn, daar anders het mycelium niet goed fijngevreven kan worden. Na deze bewerking wordt het mycelium om verder geheel te drogen, in een exsiccator gebracht. Vooral mag het stukgemaakte mycelium om verder te kunnen drogen niet meer in het droogstoofje gebracht worden, daar anders het schimmelpoeder in zeer korten tijd ontkleurt. Waarschijnlijk heeft bij deze hooge temperatuur door oxydatie een veel snellere omzetting van de kleurstoffen plaats in de stukgemaakte cellen. Groote voordeelen zou een vacuum droogoven bieden, waarover ik echter niet beschikte.

Het schimmelpoeder, dat nu verder gedroogd is in de exsiccator, kan, nadat het eerst nog eens fijn gemaakt is in een mortier, door een zeef met een zeefwijdte van $\frac{1}{3}$ m.M. gevreven worden. Het is van belang het poeder zoo fijn mogelijk te maken, omdat dan alleen de kleurstoffen door het oplosmiddel snel en volkomen uitgetrokken worden. Verder is het ook noodig voor het vergelijken van de kleur van de poeders. Voor het bepalen van de kleur, zoowel van de poeders als van de kleurstofextracten, werd de Code des couleurs van Klincksieck en Valette (1908) gebruikt. De cijfers achter de kleuren in den verderen tekst verwijzen naar de staaltjes in genoemde code.

Wanneer men het gepoederde schimmelmycelium droog en goed van de lucht afgesloten houdt, kan men het wel eenige weken bewaren, maar na verloop van eenige maan-

den ziet men duidelijk, dat de kleur aanmerkelijk afgenomen is. H o w a r d (1925) bewaarde het gedroogde gemalen tomatenpoeder, dat het carotinoïde lycopersicine bevat, gedurende 5 maanden in het donker en vond dan nog slechts heel weinig vermindering van kleur.

Wil men het mycelium langer dan een paar weken bewaren, dan is het aan te raden het niet fijn te wrijven, maar het mycelium als zoodanig te bewaren; in stukgemaakte cellen toch heeft men eerder kans op omzettingen van de kleurstof. Nog beter zou waarschijnlijk zijn het mycelium in buizen te brengen, waarin men koolzuurgas leidt en deze daarna dicht te smelten, op dezelfde wijze waarop men carotinekristallen bewaart.

HOOFDSTUK III.

De schimmelkleurstoffen.

§ 1. Microchemisch aantoonen van de kleurstof.

Went (1904) paste de kalimethode van Molisch (1896) toe op het mycelium van *Neurospora sitophila* en verkreeg carotine kristallen. Ik werkte de aangegeven methode na, bracht het mycelium gedurende eenige dagen in een goed van de lucht afgesloten glazen doos, waarin zich alcoholische kaliloog (40 % alcohol, 20 % KOH) bevond. De kaliloog wast men met gedistilleerd water gedurende eenige uren uit. Ik verkreeg kleine roode kristallen, die met geconcentreerd zwavelzuur met een geringe hoeveelheid water blauwkleuring gaven, wat ook door van Wisselingh (1915) gevonden is. Tswett (1911) wees er op, dat de kalimethode geen specifieke reactie voor de carotine is. Hiermee kan slechts zeer algemeen het aanwezig zijn van kleurstoffen van de carotinoïden-groep vastgesteld worden. Hij meent dan ook, dat de resultaten van Tammes (1900) en Kohl (1902), die gebaseerd zijn op de microchemische methode herzien moeten worden en men hiervoor de macrochemische methoden moet gebruiken.

§ 2. Oplosbaarheidseigenschappen van de kleurstof.

Hierna onderzocht ik de oplosbaarheidseigenschappen van de kleurstof uit gedroogd schimmelpoeder, verkregen op de wijze, zooals dit in het vorige hoofdstuk beschreven

is. De kleurstof is onoplosbaar in water, verdund azijnzuur en verdund zoutzuur. Oplosbaar is de kleurstof in absoluten alcohol, methylalcohol, aether en petroleumaether, die alle oranje-geel gekleurd worden; oranje wordt de kleurstof opgelost in chloroform, benzol, toluol, xylol en terpentijnolie; zwavelkoolstof, waarin de kleurstof zeer goed oplosbaar is, wordt rood-oranje gekleurd.

§ 3. Het extraheeren van het schimmelpoeder.

Van belang was nu na te gaan, welk oplosmiddel het best en het vlugst al de kleurstof uit het schimmelpoeder kan extraheeren. Volgens de opgave van T s w e t t (1906b) geven groene bladen, met petroleumaether behandeld, meer of minder gele extracten. Het hoofdpigment is carotine, maar sporen van andere pigmenten worden ook uitgetrokken. Voor het extraheeren van al het chlorophyl en de carotinoïdenpigmenten beveelt T s w e t t aan petroleumaether, bevattend 10 % absoluten alcohol voor verse bladeren, en 1 % absoluten alcohol voor gedroogde bladeren. Daar ik vermoedde, dat in de schimmel alleen carotine aanwezig was, leek het mij voldoende petroleumaether bij het droge poeder te voegen. Hiertoe bracht ik een bepaalde hoeveelheid van het gedroogde schimmelpoeder, b.v. 200 m.G., in een scheitrechtertje van 100 c.c. inhoud. Van te voren had ik onder in het trechtertje een watten propje aangebracht. Goot ik nu op het poeder 3 c.c. petroleumaether, dan kleurde deze zich direct oranje-geel. Dit herhaalde ik eenige malen, totdat tenslotte het oplosmiddel kleurloos bleef; toch was het schimmelpoeder nog niet geheel ontkleurd. Bij het afloopen van het extract merkte ik op, dat het watje steeds rose gekleurd werd en zich niet ontkleurde, wanneer ik het in verse petroleumaether legde.

Uit het bovenstaande, n.l. het niet geheel ontkleuren van het poeder, meende ik te mogen opmaken, dat er nog een

tweede kleurstof aanwezig is, die in het geheel niet of onvoldoende door de petroleumaether uitgetrokken wordt. Ik voegde daarom aan het oplosmiddel 1 % absoluten alcohol toe, omdat dan volgens T s w e t t (1906b) de carotinoïden uit de bladeren geëxtraheerd worden. Inderdaad werd het poeder nu veel meer, maar nog niet geheel ontkleurd.

Daar in het plantenrijk naast carotine heel dikwijls xanthophyl voorkomt, leek het mij heel goed mogelijk, dat de schimmel deze laatste kleurstof ook bevatte. Nu is xanthophyl heel gemakkelijk oplosbaar in methylalcohol. Voegde ik nu bij het poeder, dat reeds met petroleumaether was uitgetrokken, absoluten methylalcohol dan kleurde deze vloeistof zich dadelijk oranje-geel. Na herhaaldelijk verversen werd het poeder kleurloos en ook ontkleurde zich het rose watje.

Om het proces te bespoedigen voegde ik bij de petroleumaether direct eenige druppels methylalcohol. Wanneer men voortdurend versch oplosmiddel toevoegt bij 200 c.c. schimmelpoeder is dit na een dag geheel kleurloos uitgetrokken.

Het kleuren van het watje en het feit dat er twee oplosmiddelen noodig zijn voor het ontkleuren van het poeder, wijst er wel op, dat er meer dan één kleurstof aanwezig is.

Door C o w a r d (1924) wordt vermeld, dat verzeeping met 20 % potasch de eenige methode is voor het quantitatief uittrekken van de chromolipoiden. Voor het extraheeren van de kleurstoffen van *Neurospora* was deze methode echter niet bruikbaar, daar het schimmelpoeder zeer langzaam ontkleurd werd en het extract niet in aether over te voeren was.

§ 4. Capillairanalyse van Goppelsroeder.

Om meer zekerheid te verkrijgen, dat er inderdaad meer dan één kleurstof in de schimmel aanwezig was, paste ik de

capillairanalyse van G o p p e l s r o e d e r (1901) toe, die o.a. ook door K y l i n (1927) gebruikt is voor het bepalen van carotinoïde kleurstoffen in alle mogelijke vruchten.

Deze analyse berust op de eigenschap, dat de componenten van een kleurstofoplossing een ongelijk opstijgingsvermogen bezitten in eenzelfde capillairmedium b.v. in een strook filtreerpapier. Ik behandelde het schimmelpoeder alleen met petroleumaether en bracht dit extract in een reageerbuisje, waarin een strook filtreerpapier gehangen werd, zoodanig, dat slechts een klein deel van het papier in de vloeistof stak. Dit liet ik gedurende eenigen tijd staan en nu zag ik, dat langzamerhand de kleurstof naar boven steeg. Wanneer de stijging opgehouden is, wordt het filtreerpapier uit de vloeistof genomen en gedroogd. Het deel, hetwelk in de vloeistof gestaan heeft en een groot deel er boven is rose gekleurd, terwijl er een smalle geel-oranje band hieraan grenst. Ook dit wijst er dus op dat er minstens twee kleurstoffen aanwezig moeten zijn, en dat deze beide, ook al is het dan niet volkomen, door petroleumaether uitgetrokken worden.

Wanneer ik het pigment volkomen uit het schimmelpoeder met petroleumaether en een weinig methylalcohol uittrok en de kleurstoffen uit dezen laatste in de eerste overvoerde, volgens de methode nog te noemen op pag.21, en vervolgens den methylalcohol verwijderde, dan kreeg ik toch hetzelfde beeld met de capillairanalyse, als wanneer ik zonder methylalcohol gewerkt had, waardoor ik wel den indruk kreeg, dat er niet meer dan twee kleurstoffen aanwezig zijn.

Om nu de carotinoïden te scheiden, paste ik de chromatografische analyse van T s w e t t toe, waarvan ik eerst het principe en de methodiek in de volgende paragrafen bespreken zal.

§ 5. De chromatografische analyse van Tswett.

T s w e t t (1906 b en c) vermeldt, dat de verschillende gekleurde bestanddeelen van de chloroplasten in bepaalde oplosmiddelen zeer karakteristieke adsorptiecoëfficiënten vertoonen ten opzichte van fijn verdeeld materiaal als CaCO_3 , inuline, saccharose en vele andere stoffen, mits deze laatste onoplosbaar zijn in het gebruikte oplosmiddel en indien ze in fijn verdeelden toestand verkregen kunnen worden.

Volgens P a l m e r (1922) is het bovengenoemde toe te schrijven aan het feit, dat verschillende gele chromolipoiden van de chloroplasten in organische oplosmiddelen als colloïden aanwezig zijn, en dat naarmate de colloïdale deeltjes groter zijn, deze meer geadsorbeerd worden. Enkele stoffen als carotine, die niet geadsorbeerd wordt, zijn in ware oplossing aanwezig.

T s w e t t vond petroleumaether, het oplosmiddel van carotine, het best geschikt om de adsorptie eigenschappen na te gaan. Ook zwavelkoolstof is goed te gebruiken, omdat alle pigmenten van de chloroplasten hierin zeer sterk gekleurd zijn. Hij heeft aangetoond, dat zorgvuldig gedroogde CaCO_3 , inuline, saccharose, die onoplosbaar zijn in petroleumaether, het xanthophyl geheel zullen adsorbeeren, wanneer de petroleumaetheroplossing geschud wordt met een overmaat van het adsorbens. Opdat de adsorptie volledig zal zijn, mag geen spoor van alcohol aanwezig zijn. T s w e t t heeft gevonden, dat petroleumaether, die slechts 1 % alcohol bevat, het grootste deel van het xanthophyl van het adsorbens bevrijdt.

Deze methode kan dienen om de carotinoïden, welke zuurstof bevatten, zooals b.v. xanthophyl, te scheiden van die, welke zuurstofvrije moleculen bezitten, zooals b.v. carotine.

Volgens T s w e t t kan men de verschillende zuurstof-

houdende carotinoïden van elkaar scheiden. Het algemeene principe berust hierop, dat, wanneer verschillende stoffen aanwezig zijn in eenzelfde oplosmiddel, die alle geadsorbeerd worden door eenzelfde adsorbens er meer of minder verplaatsing is van een geadsorbeerde stof door de andere. Dit is afhankelijk van de betrekkelijke affiniteiten van de verschillende stoffen voor dit adsorbens.

Op dit principe berust T s w e t t 's chromatografische analyse. Indien er in *Neurospora sitophila* meer dan twee carotinoïden aanwezig mochten zijn, die niet met de capillairanalyse voor den dag zijn gekomen, dan zouden ze nu met T s w e t t 's methode te voorschijn moeten komen.

S c h e r t z (1929) bestrijdt de opvatting van T s w e t t, dat alleen carotine niet geadsorbeerd wordt en xanthophyl wel. Hij wijst er op, dat T s w e t t nooit met kristallen van de chromolipoiden-pigmenten heeft gewerkt. De beide oplossingen van carotine en xanthophyl, waarmee T s w e t t werkte, moeten dus beide belangrijke sporen van elkaars pigment bevat hebben, alsook een belangrijke hoeveelheid van de oxydatieproducten van de twee pigmenten. Dit moet duidelijk zijn voor ieder, die kristallen isoleerde van carotine en xanthophyl en die dan bovendien de groote hoeveelheid niet kristalliseerbaar materiaal opgemerkt moet hebben. Werkt men met geheel zuivere carotine en xanthophyl uit kristallen verkregen, dan ziet men, dat carotine niet geadsorbeerd wordt door CaCO_3 en xanthophyl slechts betrekkelijk, d.w.z. dat deze veel langzamer door een CaCO_3 kolom gaat dan carotine.

§ 6. Methodiek van de chromatografische analyse van Tswett.

De methode, die gebruikt wordt voor de analyse van een mengsel van carotinoïden is de volgende:

Een zeer fijn verdeeld adsorbens, dat de te onderzoeken stoffen niet oxydeert of reduceert, wordt aanbevolen,

b.v. CaCO_3 . Eerst wordt de CaCO_3 gedurende eenige uren gedroogd bij 150°C . en daarna bewaard in goed sluitende flesschen. Een glazen adsorptiebuis, met een diameter van 1—2 cM. en een lengte van 10—15 cM. en aan één zijde uitgetrokken in een smal buisje, dat een kleine opening heeft met een diameter van 1—2 mM., wordt hiervoor gebruikt. Op den overgang van de breedere in de smallere buis bevindt zich een wattenprop en hierop wordt CaCO_3 aangebracht, welke goed vast aangedrukt moet worden. De homogeniteit van de zuil is zeer belangrijk voor de regulariteit van de adsorptiezones. De buis wordt tot op 2 à 3 cM. van den rand gevuld en de CaCO_3 door een wattenprop afgesloten. De buis wordt geplaatst op een kolf, die verbonden is met de waterstraalluchtpomp. Het zuivere oplosmiddel (hetzij petroleumaether, hetzij zwavelkoolstof, afhankelijk van het gekozen oplosmiddel voor het pigment) wordt nu op de kolom gegoten en door middel van lichte zuiging wordt het adsorbens bevochtigd. De zuiging wordt stopgezet en de bovenste wattenprop verwijderd.

Deze voorafgaande bewerking is noodzakelijk voor den regelmatigigen gang van de chromatografie. Geschiedt deze niet, dan kan het gebeuren, dat bij het opgieten van de te onderzoeken vloeistof de bovenste lagen van het adsorptiepoeder door de zich daaronder vormende luchtbellen omgeworpen worden.

Een oplossing van de kleurstof wordt in de buis gegoten en door middel van lichte zuiging door de kolom gevoerd. Regelmatig wordt zuiver oplosmiddel toegevoegd, zoodat er voortdurend een stroom door de kolom heengezogen wordt. De laag pigment zakt langzaam naar beneden en zal zich in zones van relatieve adsorptie differentieeren, die van de grootste adsorptieaffiniteit bij den top, die van de minste bij den bodem. Hoe gelijkmatiger de kolom aangedrukt is, des te meer zullen de zones ware ringen wor-

den. Toch zijn werkelijk ware adsorptieringen moeilijk te verkrijgen.

P a l m e r (1922) merkt op, dat de pigmenten in de verschillende zones, door deze methode verkregen, niet zuiver zijn, zooals T s w e t t beweert; ze kunnen echter gezuiverd worden door herhaling van de analyse van het pigment in een bepaalde zone verkregen.

§ 7. Toepassing van de chromatografische analyse op de schimmelkleurstoffen.

Voordat ik de chromatografische analyse kon toepassen was het noodig, dat de kleurstoffen zich in hetzelfde oplosmiddel, n.l. petroleumaether, bevonden en dat geen spoor van methylalcohol aanwezig was. T s w e t t (1906 b) kreeg een alcoholhoudende petroleumaetheroplossing van chlorophyl vrij van alcohol door de groene oplossing een aantal malen met het dubbele volume water in een scheitrechter goed uit te wasschen. Daar alcohol grootere oplossende affiniteit voor water dan voor petroleumaether bezit, kon hij den alcohol op deze wijze practisch geheel uit de chlorophyl-oplossing verwijderen.

Toen ik nu bij het twee fasen-systeem, petroleum-aether en methylalcohol, waarin zich de kleurstoffen bevonden, water voegde, vormde zich op de scheidingslaag een emulsie, die niet verdween, terwijl de waterige methylalcohol nog tamelijk sterk gekleurd bleef.

G o e r r i g (1917) heeft waarschijnlijk dezelfde moeilijkheid gehad. In tegenstelling met W i l l s t ä t t e r en S t o l l (1913) was het haar vaak onmogelijk al het xanthophyl uit den methylalcohol in aether over te voeren na langzaam toevoegen van water.

S c h e r t z (1925 b) geeft aan, dat het extract van xanthophyl in methylalcohol in aether overgevoerd kan worden door het hiermee te schudden en evenveel van een

verzadigde keukenzoutoplossing toe te voegen, als er methylalcohol aanwezig is.

Door het toevoegen van de electroliet NaCl voorkomt men de vorming van een emulsie op de scheidingslaag van de petroleumaether en den methylalcohol. Aanvankelijk vormde zich wel een troebeling, maar deze trok na eenige uren rustig staan weer op. De waterige methylalcoholoplossing is nu ook nagenoeg kleurloos, maar nog niet geheel helder. Dit is te wijten aan het feit, dat zich om enkele kleurstofdeeltjes een NaCl mantel vormt, die het daardoor onmogelijk maakt, dat deze deeltjes in de petroleumaether kunnen overgaan. Hoe minder geconcentreerd de NaCl oplossing is, zoo, dat er nog juist genoeg is om te voorkomen, dat zich een emulsie vormt, des te helderder wordt de methylalcohol en des te minder kleurstofdeeltjes blijven in die vloeistof achter. Het bleek mij, dat een 6 % NaCl oplossing voor het doel geschikt was.

Als nu alle kleurstof overgevoerd is in de petroleumaether moet deze volgens Tswett (1906 a) driemaal geschud worden met het dubbele volume water om de laatste sporen methylalcohol te verwijderen. Ik liet daarna de petroleumaether eenigen tijd in den scheitrechter staan, om het water te laten zakken en dan af te laten loopen. Daar de afvoerbuys van den scheitrechter langs de zijkan ten hierdoor vol waterdruppels is gekomen en deze bij het laten afloopen van de petroleumaether heel gemakkelijk meegevoerd zouden worden, goot ik het extract liever door den hals van den trechter op de calciumcarbonaat kolom, die van te voren bevochtigd was met petroleumaether. Voor quantitatief werk heeft deze wijze van overschenken zijn bezwaren, daar het bijna niet te voorkomen is, dat er wat van het extract verloren gaat. Toch leek mij dit beter, dan, zooals b.v. Goerrig (1918) aangeeft, het petroleum-aetherextract te drogen, door het door een trechter met

een weinig Na_2SO_4 te laten gaan. Door C o w a r d (1924) is n.l. gevonden, dat Na_2SO_4 de chromolipoïden adsorbeert, waardoor door deze manier van drogen wat kleurstof verloren gaat.

Ik gebruikte calciumcarbonaat pro analyse van Merck, dat voldoende gezuiverd is om te voorkomen, dat er verontreinigingen aanwezig zouden kunnen zijn, die dan misschien niet geheel zonder chemischen invloed op de kleurstofextracten waren. De buis werd op een reageerbuis geplaatst en ik paste in het begin geen zuiging toe, zoodat de vloeistof rustig naar beneden kon zakken. Ik nam waar, dat het bovenste deel van de CaCO_3 geheel rose werd gekleurd, terwijl een gele ring steeds meer naar beneden zakte om ten slotte als gele (221—206)¹⁾ druppels in de reageerbuis terecht te komen. Als al het extract in het CaCO_3 gezakt was, voerde ik voortdurend versehe petroleummaether toe en om het doorloopen wat te versnellen paste ik soms wat lichte zuiging toe. Het watje onder in de buis werd langzamerhand geheel rose gekleurd en de vloeistof, die nu afliep, was niet geel meer, maar oranjegeel (156—161). Ik meende daarom, dat de CaCO_3 kolom niet in staat was de geheele hoeveelheid tweede kleurstof te adsorberen. Wel vond ik het merkwaardig, dat alleen het allerbovenste stuk van de kolom rose gekleurd was, terwijl de rest nagenoeg kleurloos leek. Toch voerde ik het doorgelooopen extract nog eens door een nieuwe kolom, maar deze kleurde zich niet rose, wel echter het wattenpropje onderaan. Dit bracht mij op het denkbeeld, dat er misschien nog een derde kleurstof aanwezig was, die niet, of slechts in het begin, door CaCO_3 geadsorbeerd

¹⁾ Zooals ik reeds op pag. 11 vermeldde, verwijzen de nummers achter de kleuren naar de Code des Couleurs. Zijn er twee cijfers opgegeven, dan wil dit zeggen, dat een geconcentreerde en minder geconcentreerde oplossing vergeleken zijn.

wordt en wel door watten. Om dus de adsorptie van de watten uit te schakelen, bracht ik onder in de buis een prop glaswol en voerde nieuw extract door. Het eerste extract, dat doorliep, was toch weer geel, maar werd na eenigen tijd oranje-geel. Dit wees er dus op, dat, mocht er nog een derde kleurstof aanwezig zijn, deze langzamer door de CaCO_3 ging dan de eerste. Ik voerde nu zooveel versche petroleumaether door tot deze tenslotte kleurloos afliep. In de kolom bevond zich dus slechts één kleurstof en deze moest vrijgemaakt worden van de CaCO_3 . Tswett (1906 a) maakte de pigmenten vrij met alcoholische petroleumaether, dit lukte mij niet zoo goed, ook niet, wanneer ik veel absoluten alcohol toevoegde. Daar de kleurstoffen het best uitgetrokken worden uit het schimmelpoeder met methylalcoholische petroleumaether, goot ik op de buis, die nog geheel vochtig was van de petroleumaether, absoluten methylalcohol en zag dat de rose ring direct vrijgemaakt werd en als een gele ring naar beneden schoof. In de reageerbuis druppelde eerst de laatste rest van de petroleumaether en daarna de oranje-gele (156—166) methylalcohol, die door de petroleumaether heenzakte en geen kleurstof aan deze afstond. Schudde ik echter later de twee vloeistoffen in een scheidtrechter, dan ging wel eenige kleurstof in de petroleumaether over. In deze laatste vloeistof is het pigment oranje (141) gekleurd. Wil men al het pigment uit het CaCO_3 vrijmaken, dan moet men er voor zorgen, dat de kolom nog niet geheel uitgedroogd is.

§ 8. Is er nog een derde kleurstof aanwezig?

De vloeistof, die afgeloopen is uit de CaCO_3 buis, waarin zich onderin glaswol bevond, voerde ik door een buis, waarin zich een groote hoeveelheid watten bevond, die ik goed vast aandrukte. De watten kleurden zich onmiddel-

lijk rose. Ik overgoot ze met versche petroleumaether, en zag, dat een geel (221—206) extract afliep. Ik goot net zoo lang petroleumaether over de watten, totdat de vloeistof kleurloos afliep en zag dat de watten rose gekleurd bleven. Overgoot ik nu de watten, die nog vochtig waren van de petroleumaether, met absoluten methylalcohol, dan werd onmiddellijk de kleurstof vrij gemaakt en zakte deze als een rose ring naar beneden. In de reageerbuis, waarin eerst de laatste resten ongekleurde petroleumaether afliepen, druppelde nu de licht oranje-rose (121) gekleurde methylalcohol af. Zoodra dit extract in aanraking kwam met de petroleumaether, ging de kleurstof hierin over, en zakte de kleurloze methylalcohol naar beneden. Mocht deze laatste nog eenige kleurstof bevatten, dan ging na schudden onmiddellijk alle kleurstof in de petroleumaether over, en kon in een scheitrechter de ongekleurde methylalcohol van de licht oranje-rose (121) petroleumaether gescheiden worden. Inderdaad is er dus een derde kleurstof aanwezig. De drie gevonden kleurstoffen zal ik, zoolang ik hun absorptiespectra nog niet met reeds bekende carotinoïden vergeleken heb, voorloopig carotinoïde A, B en C noemen.

De oplossing van carotinoïde A is in petroleumaether geel (221—206) gekleurd. In het systeem CaCO_3 -petroleumaether wordt carotinoïde A niet geadsorbeerd, dus gedraagt het zich als carotine.

De oplossing van carotinoïde B is in methylalcohol oranje-geel (156—166), in petroleumaether oranje (141) gekleurd. In het systeem CaCO_3 -petroleumaether wordt het carotinoïde B geadsorbeerd, dus gedraagt het zich als xanthophyl en rhodoxanthine. Carotinoïde B geeft echter een rose adsorptiering, xanthophyl zooals T s w e t t (1906 c) aangeeft een gele, rhodoxanthine volgens L i p p m a a (1925) een intensief violet-bruinachtig roode, dus is carotinoïde B niet identiek met een van deze pigmenten.

De oplossing van carotinoïde C is in petroleumaether licht oranje-rose (121) gekleurd. In het systeem CaCO_3 -petroleumaether wordt het pigment niet geadsorbeerd, maar gaat langzamer door de CaCO_3 kolom dan het carotinoïde A. Het gedraagt zich dus evenals lycopine, dat, zooals Coward (1924) opgeeft, de CaCO_3 kolom rose kleurt, langzamer door de CaCO_3 kolom gaat dan carotine en waarvan de oplossing in petroleumaether rose gekleurd is. In het systeem watten-petroleumaether wordt carotinoïde C geadsorbeerd. Carotinoïde A en B zijn volgens colorimetrische bepaling in ongeveer gelijke hoeveelheid aanwezig, carotinoïde C komt echter in zeer geringe hoeveelheid voor. Hierdoor is het verklaarbaar, dat deze laatste niet waar te nemen is met de capillairanalyse van Goppelsroeder (1901).

Volgens de hierboven genoemde bewerking is het dus mogelijk de drie schimmelkleurstoffen te scheiden. Men moet echter bedenken, dat men de volgorde van de bewerking niet verwisselen kan en b.v. eerst carotinoïde C scheiden van A en B door het petroleumaetherextract direct door watten te voeren. Het is mij n.l. gebleken, dat carotinoïde B ook geadsorbeerd wordt door de watten, wat heel gemakkelijk na te gaan is als men het doorgelopen extract door een CaCO_3 kolom voert; deze blijft dan kleurloos, wat er dus op wijst, dat men alleen met carotinoïde A te doen heeft.

Bij toevoeging van methylalcohol op de wattenkolom zakt deze eerstgenoemde als een gele ring naar beneden; was alleen carotinoïde C aanwezig dan zou de ring rose gekleurd zijn. Carotinoïde C is in zoo geringe mate aanwezig, dat de gele kleur overheerscht.

Toch is deze heele methode, als men met kleine hoeveelheden werkt, eigenlijk niet voor quantitatief onderzoek te gebruiken. Ik wilde daarom probeeren of het niet mogelijk was de kleurstoffen met de uitschudmethode te scheiden.

§ 9. De uitschudmethode.

De uitschudmethode biedt in zooverre voordeelen boven de vorige, dat niet alle kleurstoffen in petroleumaether behoeven te worden overgevoerd en de aanwezigheid van methylalcohol geen bezwaar is.

Willstätter en Stoll (1913) gebruikten de uitschudmethode om de carotinoïden uit de bladeren te scheiden. Ze voegden bij 80 c.c. petroleumaether, waarin zich de carotinoïden bevonden, achtereenvolgens 100 c.c. 80 % methylalcohol, 100 c.c. 90 % methylalcohol en 2 maal 50 c.c. 92 % methylalcohol toe. Het laatste extract was meestal kleurloos; was dit niet het geval dan schudden ze nog eens met 92 % methylalcohol uit.

Ik wilde nu probeeren of het mogelijk was carotinoïde B van A en C te scheiden door de methylalcoholische petroleumaether herhaaldelijk met waterige methylalcohol van de bovengenoemde percentages in een scheitrechter uit te schudden. Hoewel ik herhaaldelijk zelfs met 92 % methylalcohol uitschudde, bleef deze voortdurend een weinig gekleurd. Ten slotte wilde ik onderzoeken of de petroleumaether vrij was van carotinoïde B en voerde daartoe de vloeistof, na deze eerst goed uitgewasschen te hebben met water, door een CaCO_3 kolom, waarin zich onderin glaswol bevond. Ik nam waar, dat zich direct boven in de CaCO_3 een rose ring vormde, die niet verdween na toevoeging van versche petroleumaether. Carotinoïde B is dus door de uitschudmethode met methylalcohol niet geheel uit de petroleumaether te krijgen. Het extract, dat door de CaCO_3 kolom gedruppeld is en nu met methylalcohol 92 % uitgeschud wordt, geeft aan dezen laatste geen kleurstof af.

Carotinoïde A en C blijven dus na uitschudden met methylalcohol in de petroleumaether; carotinoïde B daarentegen gaat uit de petroleumaether in den methylalcohol over,

maar omgekeerd gaat ook weer wat kleurstof uit den methylalcohol in de petroleumaether.

Palmer en Eckles (1914) hebben iets dergelijks gevonden voor een carotinoïde maïskleurstof; deze schijnt even gemakkelijk uit 80 % alcohol door petroleumaether als uit deze laatste door nieuwen 80 % alcohol geextraheerd te worden. Dit pigment is door Karrer, Salomon en Wehrli (1929) zeaxanthine genoemd. Toch kan carotinoïde B niet identiek zijn met deze zeaxanthine, daar dit laatste pigment noch uit petroleumaether, noch uit zwavelkoolstof door CaCO_3 geadsorbeerd wordt.

Door Lubimenko (1927) is een carotinoïde gevonden in bladeren, dat evengoed oplosbaar is in petroleumaether als in alcohol en dat door hem xanthocarotine is genoemd. Scheidt men carotine en xanthophyl op de gewone wijze, dan vindt men de xanthocarotine vermengd met de carotine in de petroleumaetherlaag en ook vermengd met het xanthophyl in de alcohol laag. Over de adsorptie-eigenschappen van xanthocarotine wordt niet gesproken, dus moet het absorptiespectrum van carotinoïde B vergeleken worden met dat van de xanthocarotine (zie hoofdstuk IV).

Carotinoïde A gedraagt zich ten opzichte van het systeem petroleumaether-methylalcohol (80 %—92 %) evenals carotine, het is epiphasisch.

Carotinoïde B gedraagt zich ten opzichte van het systeem petroleumaether-methylalcohol (80 %—92 %) niet uitgesproken hypophasisch, zooals wel voor xanthophyl en fucoxanthine door Willstätter en Stoll (1913) en voor rhodoxanthine door Lippman (1925) aangegeven wordt, waardoor het dus met geen van deze pigmenten identiek kan zijn.

Carotinoïde C gedraagt zich ten opzichte van het systeem petroleumaether-methylalcohol (80 %—92 %) evenals carotine en lycopine; het is epiphasisch.

Om nu de carotinoïden A, B, en C nader te bepalen is het verkrijgen van kristallen van groot belang. In de volgende § wil ik mijn pogingen om deze te verkrijgen bespreken.

§ 10. Het uitkristalliseeren van carotinoïden.

Het was mijn bedoeling om de carotinoïden A, B en C te doen uitkristalliseeren en te trachten na te gaan of carotinoïde A identiek was met de carotine uit de wortelen van *Daucus carota*. Hiervoor had ik ook kristallen van deze laatste nodig en daar ik wel begreep, dat het uitkristalliseeren groote moeilijkheden met zich mee zou brengen, leek het mij goed eerst te trachten zuivere kristallen van Daucus-carotine te verkrijgen. Het materiaal, dat ik hiervoor nodig had, kon ik in elke hoeveelheid verkrijgen, terwijl het schimmelmateriaal beperkt was. Voor het verkrijgen van enkele grammen kristallen moesten reusachtige hoeveelheden wortelen verwerkt worden. Escher (1909) verkreeg 125 gram kristallen van 472 kilogram gedroogde (5000 kilogram versche) wortelen. Daar het onmogelijk was deze groote hoeveelheden op het botanisch laboratorium te Utrecht te verwerken, werd mij vergund op het laboratorium voor Technische Botanie te Delft te werken. Ik ging uit van $7\frac{1}{2}$ kilogram gedroogde (100 kilogram versche) wortelen en verwerkte deze volgens de methode aangegeven door Schertz (1925 a). Ik verkreeg plus minus 2 gram kristallen, waarvan het smeltpunt 169° C. was. Na deze geheele bewerking werd het me wel duidelijk over hoeveel materiaal men beschikken moet om uitkristallisatie te verkrijgen, daar er steeds een zeer groote hoeveelheid niet-kristalliseerbaar materiaal aanwezig is. Ook Schertz (1929) wijst hier op.

Lost men eenige kristallen op in petroleumaether en eenige in zwavelkoolstof, dan wordt de eerste geel (231—236),

de tweede oranje (106—121) gekleurd. Deze kleuren wijken af van carotinoïde A opgelost in petroleumaether (206—221) en in zwavelkoolstof (56—71). De oplossing van carotinoïde A is in zwavelkoolstof zelfs rood-oranje gekleurd.

Ik kweekte een zeer groote hoeveelheid schimmels en beschikte tenslotte over 20 gram droge stof (de opbrengst van de cultuur uit één doos is plus minus 70 milligram). Ik trok het poeder uit met methylalcoholische petroleumaether en scheidde de kleurstoffen hieruit volgens de methode beschreven in § 8. Het eerst verwerkte ik carotinoïde A, dat zich in petroleumaether (kookpunt 28—40° C.) bevond en dampte de vloeistof onder verminderden druk in.

Om het stooten van de petroleumaether door de kookpuntsvertraging, die dikwijls optreedt, te voorkomen, voerde ik koolzuurgas door een fijn uitgetrokken glazen buis, die eerst over CaCl_2 geleid was. Het koolzuurgas voorkomt tevens oxydatie van het carotinoïde. Toen het oplosmiddel voor een groot deel ingedampt was, vormden zich kleine witte kristalletjes. Het waren geen carotinoïde-kristallen, want deze zijn zoo specifiek, dat ze onmiddellijk te herkennen zijn.

Ik filtreerde de witte kristallen af en dampte de rest van het extract verder in. Er vormden zich geen carotinoïde-kristallen, alleen een oranje-roode korst. Ik heb geen verdere pogingen aangewend met carotinoïde B en C, daar ik tot de overtuiging was gekomen, dat ik van een ontzaglijk veel grootere schimmelmassa uit zou moeten gaan, om uitkristallisatie te verkrijgen.

Van de afgefilterde lange witte naaldvormige kristallen, bepaalde ik het smeltpunt en vond $148\frac{1}{2}^\circ \text{C}$.

Zellner (1907) geeft op, dat een hoog moleculaire alcohol, dicht bij cholesterine staand, zeer verbreid is in schimmels. Deze stof kristalliseert gemakkelijk uit in petroleumaether en aether.

Chodat en Schopfer (1927) geven op, dat in een versche chloroformoplossing van het carotinoïde van *Mucor hiemalis* een vrij groote hoeveelheid van cholestherine aanwezig is, dat ze aantoonen met de Liebermannsche reactie. Ik paste deze reactie toe op de witte kristallen. Ze bestaat daarin, dat men zwavelzuur met azijnzuuranhydride toevoegt en daardoor een kleurverandering krijgt, die loopt van bloedrood over blauw, paarsblauw naar groen. Deze reactie geldt voor alle lichamen van de cholestherine-groep, en aangezien de reactie positief verliep, is dus hiermee bewezen, dat de kristallen tot deze groep behooren. Door Willstätter en Stoll (1913) wordt over cholestherine nog het volgende gezegd: „Beziehungen des Carotins zum Cholesterin, die sich in der Literatur oft erwähnt finden, existieren in Wirklichkeit nicht.”

§ 11. Intensiteitsbepaling van de kleurstoffen met de colorimeter.

Voor de vergelijking van de betrekkelijke kleurintensiteit van de carotinoïde-pigmenten werd de Doppelkeil-Kolorimeter volgens Bjerrum-Arrhenius gebruikt. De colorimeter is eigenlijk geconstrueerd voor de PH bepaling, maar was voor niet al te kleine hoeveelheden schimmelkleurstoffen ook wel voor mijn doel geschikt.

De gebruikte colorimeter bestaat, zooals de naam reeds aangeeft, uit een dubbele wig, die verkregen wordt door een lang rechthoekig glazen bakje door een glazen plaat, volgens de diagonaal geplaatst, in twee helften te verdeelen en een prismacomparator, die verschuifbaar op het bakje aangebracht is. In den prismacomparator bevindt zich in een reageerbuisje het carotinoïde, waarvan de kleurintensiteit vergeleken moet worden. In het glazen bakje bevindt zich in de eene helft de vergelijkingsooplossing, in de andere gedistilleerd water; door het schuiven van den comparator langs het rechthoekig glazen bakje verkrijgt men door de

plaatsing van de dubbele wig alle overgangen van de vergelijkingsvloeistof van geconcentreerd tot verdund.

Een groote moeilijkheid voor het vergelijken van de carotinoïden is het verkrijgen van een geschikte vergelijkingsoplossing. Het allerbeste zou zijn een carotinoïde-oplossing van bepaalde kleurintensiteit te gebruiken, maar dan zou deze dikwijls opnieuw gemaakt moeten worden, wat natuurlijk te groote bezwaren oplevert. De carotinoïde-oplossingen zijn n.l. onbestendig en worden door het licht en de zuurstof uit de lucht verzwakt.

In § 8 heb ik er reeds op gewezen, dat het met de kleine hoeveelheden schimmelmateriaal eigenlijk niet mogelijk is de pigmenten zoodanig te scheiden, dat ze voor quantitatief onderzoek gebruikt kunnen worden. Voor het colorimetrisch onderzoek leek het mij dus beter de drie kleurstoffen niet te scheiden. Het was nu noodig een vergelijkingsoplossing te vinden, die overeenkomt met het petroleumaetherextract, dat het mengsel van de drie carotinoïden bevat. Door Willstätter en Stoll (1913) werd een 0,2 % kaliumbichromaatoplossing gebruikt voor het vergelijken van carotine- en xanthophylopplossingen. Het bleek echter, dat deze vergelijkingsoplossing niet geschikt is voor het mengsel van de drie schimmelkleurstoffen. De kaliumbichromaatoplossing komt wel overeen met een vrij geconcentreerde oplossing van de drie schimmelpigmenten, niet echter met een verdunde, daar een minder geconcentreerde kaliumbichromaatoplossing een groene tint heeft, die de carotinoïden niet bezitten.

Een methylooranje-oplossing voldoet echter zeer goed, zowel voor verdunde als voor geconcentreerde oplossingen, die de drie carotinoïden bevatten.

Bij het gebruik van methylooranje als vergelijkingsvloeistof moet men bedenken, dat men hier te doen heeft met een indicator, zoodat men de oplossing in een kolf van Jena- of pyrexglas moet bewaren om te voorkomen, dat er alkali

afgegeven wordt. Maakt men een flinke hoeveelheid van een geconcentreerde oplossing van methyloranje, dan kan men gedeelten hiervan meer of minder verdunnen al naarmate men meer of minder geconcentreerde kleurstofoplossingen colorimetrisch vergelijken moet. Bovendien is een geconcentreerde methyloranjeoplossing te vergelijken met een 0,2 % kaliumbichromaatoplossing, die steeds houdbaar is, zoodat gecontroleerd kan worden of de eerstgenoemde oplossing niet in kleur verzwakt en tevens is dan hierdoor de concentratie vastgelegd.

Om de kleurstoffen colorimetrisch te kunnen vergelijken, moeten ze steeds, nadat ze uit het schimmelpoeder geextraheerd en in de petroleumæther overgevoerd zijn, in het reageerbuisje van de colorimeter tot een bepaald volumen ingedampt worden. Er moet minstens 3 c.c. van de vloeistof in het reageerbuisje aanwezig zijn, wil men deze in den prismacomparator duidelijk kunnen waarnemen. Het reageerbuisje werd geijkt op 3 c.c. en de vloeistof tot dit volumen ingedampt.

Daar de carotinoïden aan geen hooger temperatuur dan 40° C. blootgesteld mogen worden, moet het extract onder verminderden druk ingedampt worden. Hiertoe bracht ik het reageerbuisje in een wijdere glazen buis, die gesloten was met een dubbeldoorboorde gummistop. In de eene opening bevindt zich een korte omgebogen glazen buis, die niet in de vloeistof reikt en in verbinding staat met de waterstraalluchtpomp; in de andere opening past een lange capillair uitgetrokken glazen buis, die diep in de vloeistof gestoken wordt en aan het bovineinde met een kurkje gesloten is. Daar dit kurkje nooit volkomen afsluit, wordt, wanneer zuiging toegepast wordt, een heel zwakke luchtstroom door de vloeistof gezogen, waardoor stooten voorkomen wordt. Om het indampen van de petroleumæther nog te versnellen wordt om de groote glazen buis een waterbad geplaatst, waarin het water een temperatuur van $\pm 40^{\circ}$ C. heeft.

Moeten grootere hoeveelheden kleurstofextracten ingedampt worden, zoodat de geheele bewerking vrij langdurig is, dan verdient het aanbeveling niet lucht, maar koolzuurgas door de capillaire buis te leiden, om oxydatie van de carotinoïden te voorkomen.

Tenslotte heeft het verdere onderzoek er niet toe geleid, deze colorimeter voor quantitative bepalingen te gebruiken. Toch leek het mij niet overbodig te vermelden, hoe eventueel de intensiteit van de kleurstoffen colorimetrisch vergeleken kan worden.

HOOFDSTUK IV.

Bepaling van de absorptiespectra.

§ 1. Qualitatieve bepaling van de absorptiespectra met de spectrograaf.

In § 10 van het vorige hoofdstuk heb ik reeds meege-deeld, dat het mij niet gelukt is kristallen van de schimmel-carotinoïden te verkrijgen. Door middel van de absorptie-spectra van de schimmelpigmenten is het mogelijk ze met reeds bekende carotinoïden te vergelijken. Carotine heeft in zijn verschillende oplosmiddelen een zeer karakteristiek spectrum; door de meeste onderzoekers worden twee, soms drie absorptiebanden in het groene en blauwe deel van het spectrum opgegeven. De ligging van de banden varieert eenigszins met den brekingsindex van de oplosmiddelen. Door P a l m e r (1922) wordt echter vermeld, dat de banden identiek zijn in aether, alcohol en petroleumaether, omdat de brekingsindices van deze oplosmiddelen dicht bij elkaar liggen, in zwavelkoolstof daarentegen, die een hoo-geren brekingsindex heeft, worden de banden verschoven naar het roode deel van het spectrum. Voorts meent hij, dat de breedte en de intensiteit van de absorptiebanden afhangt van de concentratie van de kleurstofoplossing en van de dikte van de laag, die het licht moet passeeren en dan bovendien nog van het oog van den waarnemer. Hierdoor wordt het duidelijk, dat de opgaven van verschillende on-derzoekers wel eens wat uiteenloopen, vooral ook omdat de absorptiebanden niet scherp begrensd zijn.

K o h l (1902) geeft de volgende bepalingen van de ab-

sorptiebanden (in $\mu\mu$) van carotine in oplosmiddelen met verschillenden brekingsindex.

oplosmiddel	brekings- index	band I	band II	band III
aether	1,357	490-475	455-445	430-418
alcohol	1,358	490-475	455-445	430-418
zwavelkoolstof	1,628	510-485	470-458	437-425

Willstätter en Stoll (1913) geven de volgende metingen van de absorptiebanden (in $\mu\mu$) van carotine in oplossingen bevattend 0,005 gram in 1 liter alcohol of zwavelkoolstof.

oplosmiddel	laagdikte	band I	band II	eind- absorptie
alcohol	5 m.M.	492-478	459-446	415-
„	10 m.M.	492-476	459-445	419-
zwavelkoolstof	5 m.M.	524-510	489-475	
„	10 m.M.	525-508	490-474	

Voor het kwalitatief bepalen van de absorptiebanden van *Daucuscarotine* en de *schimmelcarotinoïden* werd een Fuess-spectograaf gebruikt. 0,005 gram *Daucuscarotine*-kristallen werden opgelost in 1 liter petroleumaether, een andere 0,005 gram in 1 liter zwavelkoolstof.

Veel moeite kostte het van beide oplossingen een vrij duidelijk spectrogram te verkrijgen. In beide oplosmiddelen vertoont carotine drie absorptiebanden, in zwavelkoolstof gaan de twee eerste banden bijna in elkaar over. De plaats van de banden (in $\mu\mu$) is als volgt:

oplosmiddel	band I	band II	band III
petroleumaether	491-475	457-445	427-418
zwavelkoolstof	521-500	488-471	455-442

Zooals men op plaat I no. 2 en 3 kan zien is het heel moeilijk, door het diffuse karakter van de grenzen van de banden, nauwkeurig de plaats op te geven. De metingen voor de carotine komen nagenoeg overeen met de opgaven van Willstätter en Stoll (1913).

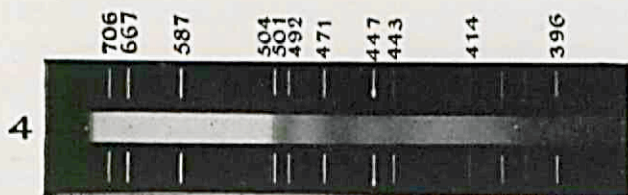
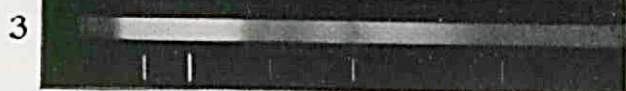
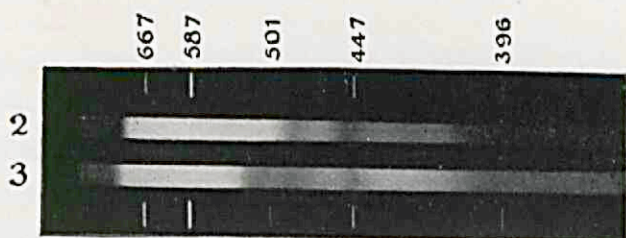
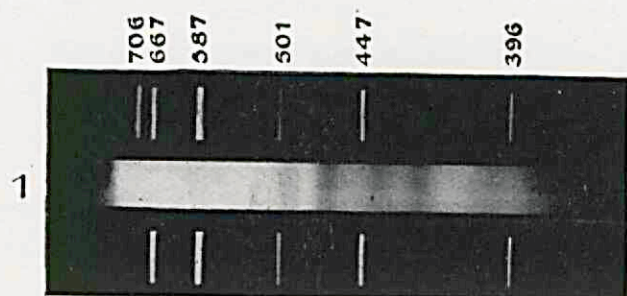
Voor de schimmelcarotinoïden was het bij gebrek aan kristallen niet mogelijk van een oplossing van bepaalde concentratie uit te gaan. In de volgende paragraaf zal ik bespreken, hoe ik voor *Daucus*carotine-oplossingen van verschillende concentraties uitmaakte, dat de plaats van de absorptiebanden steeds dezelfde blijft.

Uit het gedroogde schimmelpoeder is het carotinoïde A het gemakkelijkst met petroleumaether te extraheeren. Van deze oplossing trachtte ik een spectrogram te verkrijgen, wat mij tenslotte ook gelukte. Op plaat I no. 1 zijn heel duidelijk 5 absorptiebanden waar te nemen. De plaats van de banden (in $\mu\mu$) is als volgt:

oplos- middel	band I	band II	band III	band IV	band V
petroleum- aether	501-484	474-458	445-435	423-412	405-398

Zooals men ziet, zijn de absorptiebanden van carotinoïde A, als men ze vergelijkt met die van *Daucus*carotine, naar het rood verschoven. Bovendien heeft carotinoïde A vijf absorptiebanden, wat mij eerst heel vreemd leek, omdat er bij de tot nog toe bekende carotinoïden hoogstens vier waargenomen zijn. Na de metingen met den monochromator, beschreven in de volgende paragraaf, geloof ik, dat de meeste carotinoïden wel meer dan drie absorptiebanden bezitten, maar dat deze meestal niet met het oog of op de fotografie waar te nemen zijn. Het verschijnen van absorptiebanden op een spectrogram is n.l. van verschillende omstandigheden, als goede concentratie, juiste belichtingstijd en plaat-

PLAAT I.



Spectrogram van de absorptiebanden van:

1. Carotinoïde A in petroleumaether.
2. Daucuscarotine in petroleumaether.
3. Daucuscarotine in zwavelkoolstof.
4. Carotinoïde B in methylalcohol.

gevoeligheid, afhankelijk. Door een toevallig goede combinatie van deze factoren zijn voor carotinoïde A vijf banden op de fotografie te voorschijn gekomen.

Van het carotinoïde B werden de absorptiebanden bepaald in methyalcohol, daar het pigment in dit oplosmiddel het gemakkelijkst te verkrijgen is. Op plaat I no. 4 ziet men duidelijk drie absorptiebanden, waarvan de plaats (in $\mu\mu$) als volgt is:

oplosmiddel	band I	band II	band III
methyalcohol	503-488	474-458	444-434

De plaats van de banden van carotinoïde B in methyalcohol is bijna dezelfde als van de eerste drie van carotinoïde A in petroleumather. Daar de beide pigmenten zich echter in verschillende oplosmiddelen bevinden, is de plaats van de banden niet precies te vergelijken. Bovendien is ook uit een spectrogram de plaats van de absorptiebanden, door de grenzen hiervan te meten, niet juist te bepalen; deze grenzen moeten eerst gecorrigeerd worden voor plaatgevoeligheid en dispersie. Met behulp van intensiteitsmetingen is de plaats van de absorptiebanden langs fotografischen weg wel juist te bepalen, maar, daar mij een snellere apparatuur ter beschikking stond, heb ik dit niet gedaan.

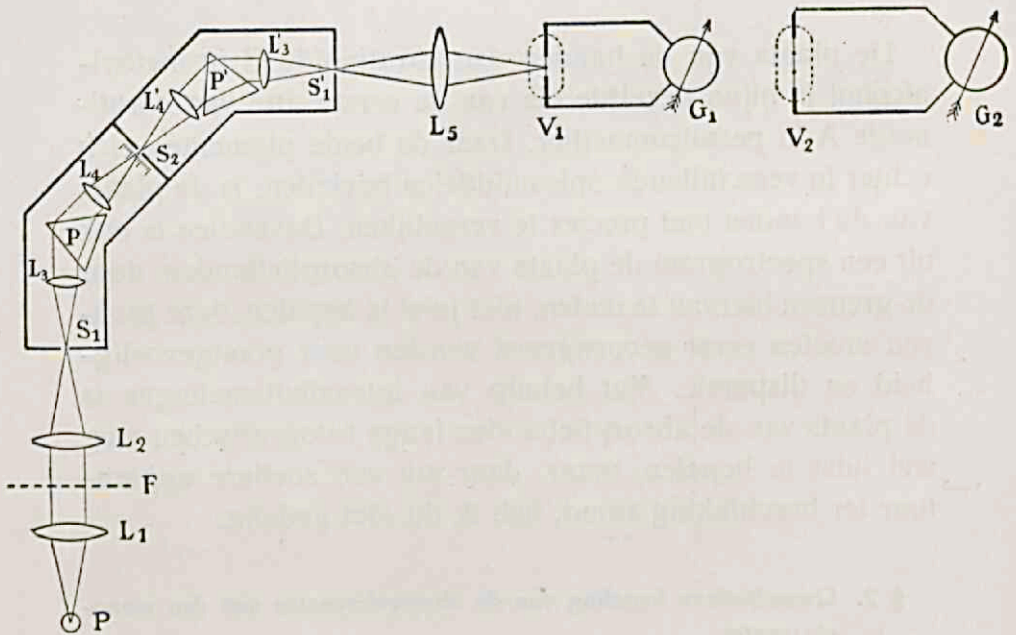
§ 2. Quantitatieve bepaling van de absorptiespectra met den monochromator.

Voor de bepaling van absorptiespectra van de carotinoïden is de opstelling (fig. 1) als volgt:

Het licht van de lamp P, die op constante spanning brandt, wordt evenwijdig gemaakt door de lens L_1 en passeert de cuvet F, waarin zich de kleurstofoplossing bevindt. Een beeld van de lamp wordt dan door de lens L_2 geprojecteerd op de spleet S_1 , van een dubbelmonochromator van

van Cittert (1923), die geen valsch licht doorlaat. Dit apparaat is samengesteld uit twee precies gelijke monochro-

FIG. 1.



mators, de eerste $S_1 L_3 P L_4$ en de tweede $S'_1 L'_3 P' L'_4$. De gang van de stralen is duidelijk te zien in fig. 1, waarin

de lenzen aangegeven zijn door L_3, L_4, L'_4 en L'_3 en de prisma's door P en P' . In het vlak van spleet S_2 wordt door den eersten monochromator een spectrum gevormd. Door den stand te varieeren van spleet S_2 , die verplaatsbaar is met behulp van een schroef, kan in den tweeden monochromator licht van een bepaalde golflengte intreden. De spleetstanden zijn met een noniusaflezing nauwkeurig reproduceerbaar. Wordt S_2 zoodanig ingesteld, dat rood licht in den tweeden monochromator kan intreden, dan zal door S_2 , behalve het roode, ook nog valsch licht (van andere golflengte) doorgelaten worden. Het valsche licht zal echter onder een anderen hoek in het prisma P' gebroken worden en zal niet op de spleet S'_1 geprojecteerd worden. Op deze wijze wordt het valsche licht in een dubbelmonochromator geëlimineerd.

Het beeld van spleet S'_1 wordt op zijn beurt geprojecteerd op een vacuumthermoelement V_1 , door lens L_5 . De ontstane thermostroom wordt gemeten met de versterkingsopstelling (galvanometer G_1 , thermo-relais V_2 en galvanometer G_2) volgens M o l l en B u r g e r (1925).

De monochromator moet vooraf nauwkeurig geijkt zijn, b.v. met heliumlijnen, zoodat het verband tusschen de doorgelaten golflengten en den noniusstand bekend is. Men meet nu den uitslag van de cuvet met de kleurstofoplossing en die van de cuvet alleen met het oplosmiddel. De doorlating wordt verkregen door den eersten uitslag door den tweeden te deelen om de absorptie van de cuvet en het oplosmiddel te elimineeren.

Bepaalt men nu de doorlating van het aantal golflengten in het zichtbare deel van het spectrum voor een kleurstofoplossing, dan kan men een absorptiekromme verkrijgen, door op de abscis de golflengten en op de ordinaat de gevonden procentueele doorlating af te zetten. Men verkrijgt dan een kromme met verschillende maxima, welke met absorptiebanden van de kleurstof overeenkomen.

Voordat echter de absorptiekrommen van de verschillende carotinoïden bepaald werden, moest eerst uitgemaakt worden, of concentratieverschil van de kleurstofoplossingen invloed uitoefent op de plaats van de absorptiebanden. Dit was noodzakelijk, omdat ik, zooals reeds in de vorige paragraaf vermeld is, bij de schimmelcarotinoïden niet van dezelfde concentratie uit kon gaan.

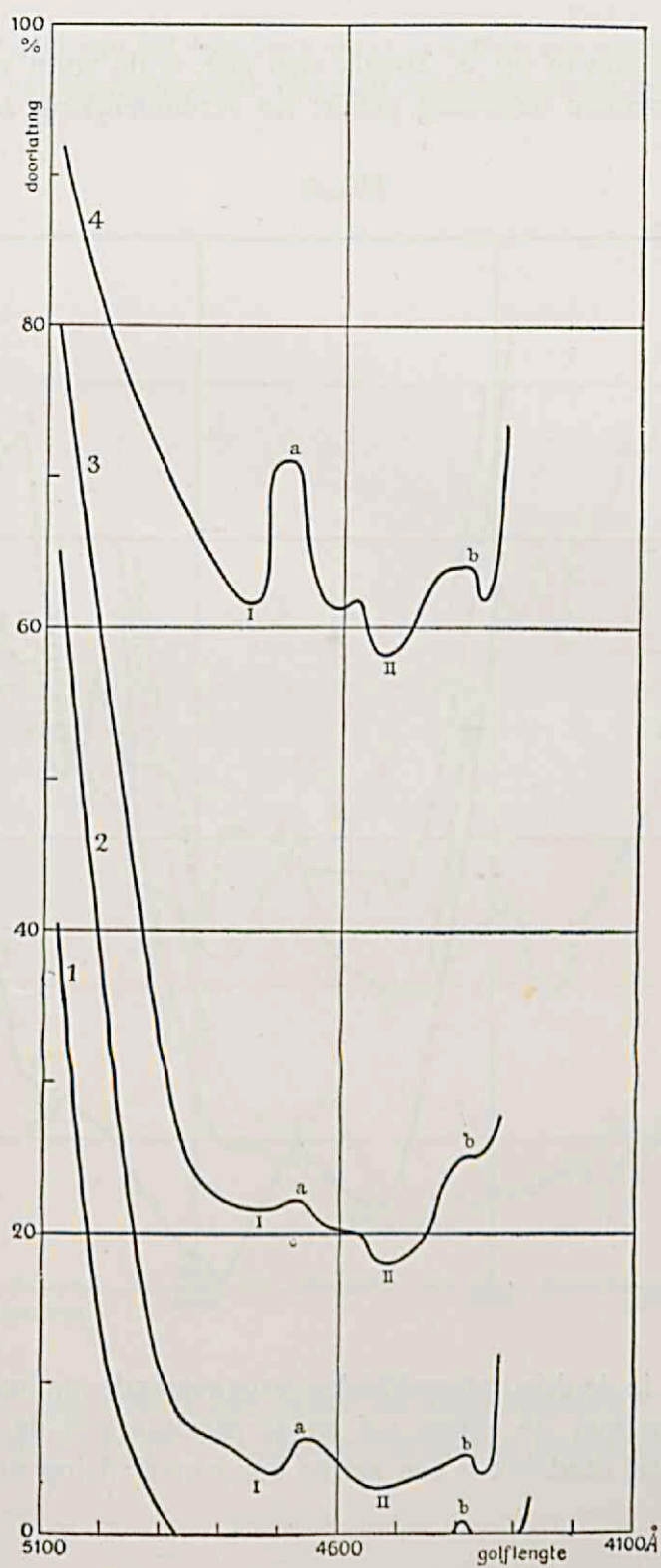
Van de kristallen van *Daucuscarotine* werden 10 m.G. in 1 liter aether opgelost en van een gedeelte hiervan werden drie verschillende verdunningen gemaakt. Van deze oplossingen, die in een goed afgesloten cuvet werden gebracht om verdamping te voorkomen, werden de eerste twee absorptiebanden bepaald.

De absorptiekrommen van de vier oplossingen, waarvan zich de concentraties verhouden als $1 : \frac{1}{2} : \frac{1}{4} : \frac{1}{16}$, worden in fig. 2 respectievelijk aangeduid met de nummers 1, 2, 3 en 4. Zooals men ziet, is de plaats van de maxima I en II van de vier krommen dezelfde en heeft dus geen bandverschuiving plaats, wat ook heel duidelijk uitkomt als men de punten a onderling en de punten b onderling vergelijkt. Wel merkt men op, dat de vorm van de kromme verandert met de concentratie. Hoe minder geconcentreerd de kleurstofoplossing is, hoe meer de maxima uitgerekt worden in de richting van de ordinaat. Bij de meest geconcentreerde oplossing wordt al het licht van 4875—4400 Å geabsorbeerd.

Daar dus concentratieverschillen van de carotine-oplossing geen invloed uitoefenen op de plaats van de absorptiebanden, kunnen nu de absorptiespectra van *Daucuscarotine* en de schimmelcarotinoïden bepaald en onderling vergeleken worden.

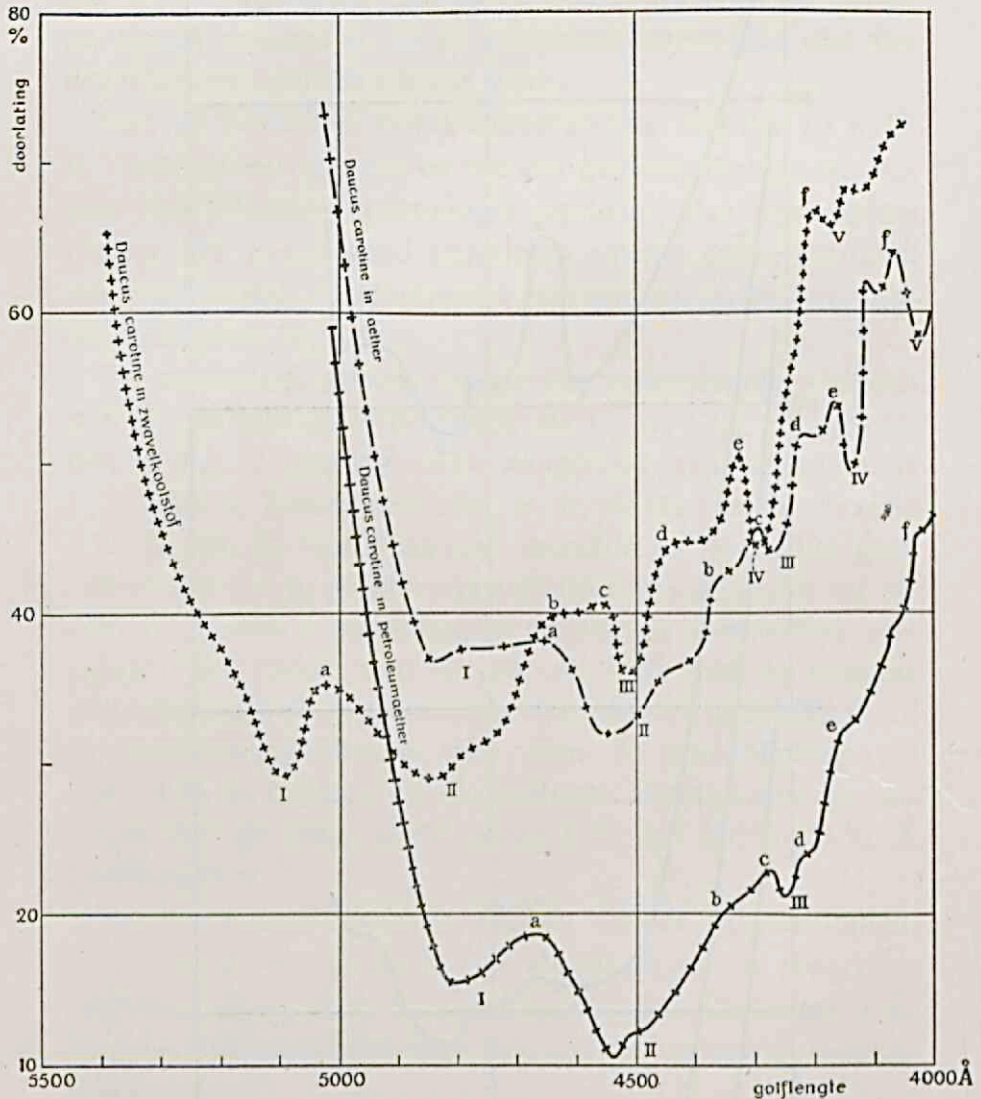
Eenige kristallen van *Daucuscarotine* werden opgelost in zwavelkoolstof, aether en petroleumaether en van deze drie oplossingen werden de absorptiekrommen bepaald, die aan-

FIG. 2.



gegeven zijn in fig. 3. Zooals men ziet, is de vorm van de drie krommen nagenoeg gelijk; ter verduidelijking zijn de

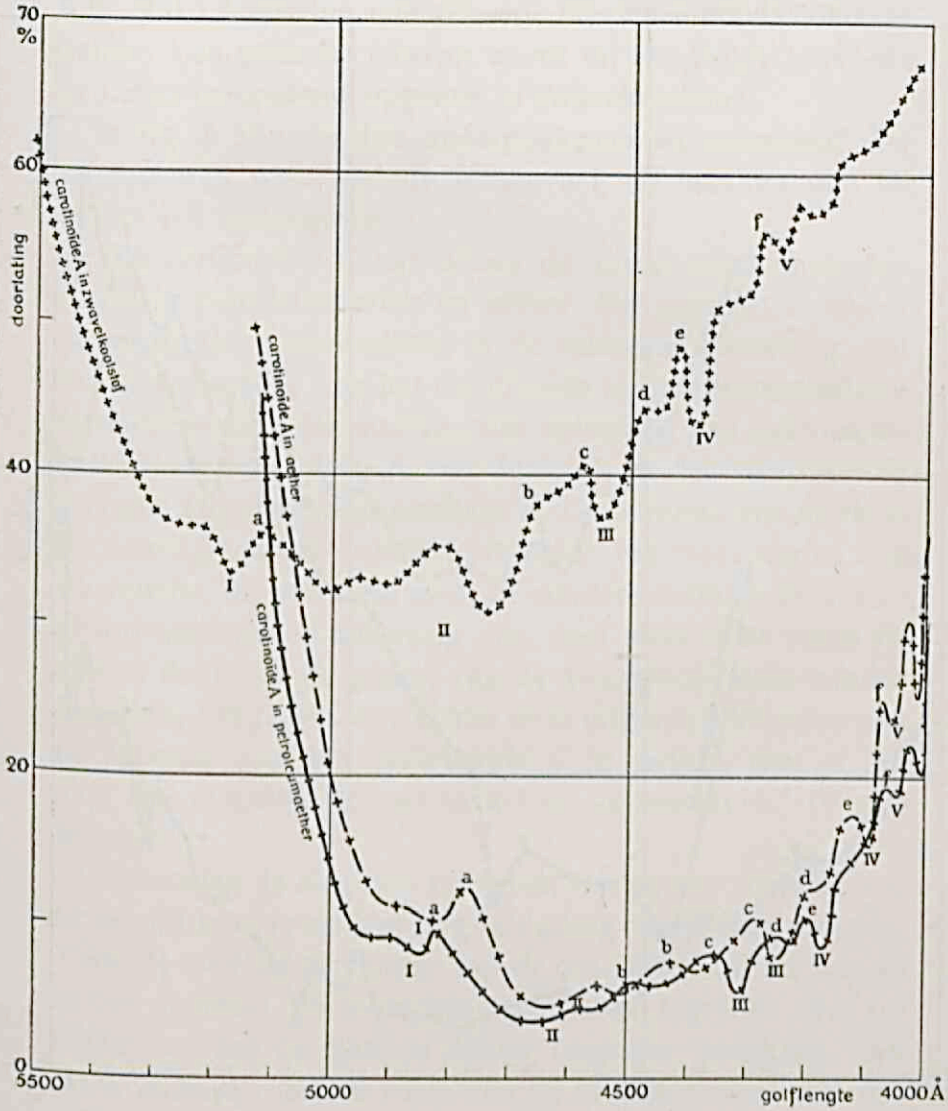
FIG. 3.



telkens in de drie oplosmiddelen terugkerende minima aangegeven met de letters a-f en de maxima met de cijfers I-V. Heel duidelijk is een sterke bandverschuiving naar het

roode deel van het spectrum waar te nemen van carotine opgelost in zwavelkoolstof, daar dit oplosmiddel een hooger en

FIG. 4.

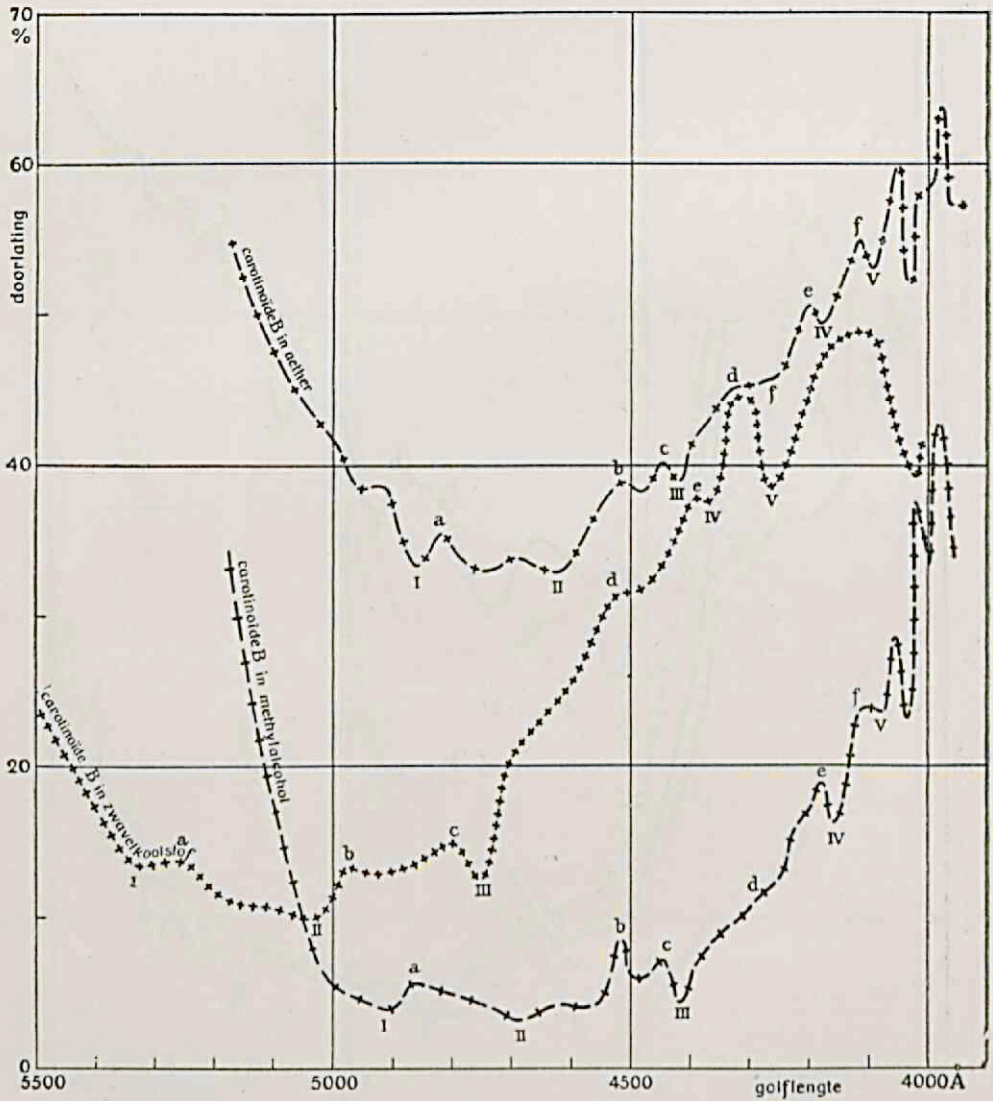


brekingsindex heeft dan aether en petroleumaether.

In fig. 4 zijn de drie absorptiekrommen aangegeven van

carotinoïde A in de drie oplosmiddelen zwavelkoolstof, aether en petroleumaether. Het gemakkelijkst krijgt men dit

FIG. 5.



pigment in zwavelkoolstof of aether opgelost door het petroleumaetherextract tot een droge korst in te dampen

en dan in zwavelkoolstof of aether op te lossen. In de drie krommen zijn ook hier de telkens terugkerende minima met a-f en de maxima met I-V aangegeven.

Carotinoïde B is opgelost in zwavelkoolstof, methylalcohol en aether. Het pigment wordt door toevoegen van een 6 % NaCl oplossing overgevoerd uit den methylalcohol in aether. Een gedeelte hiervan wordt tot een droge korst ingedampt en opnieuw opgelost in zwavelkoolstof.

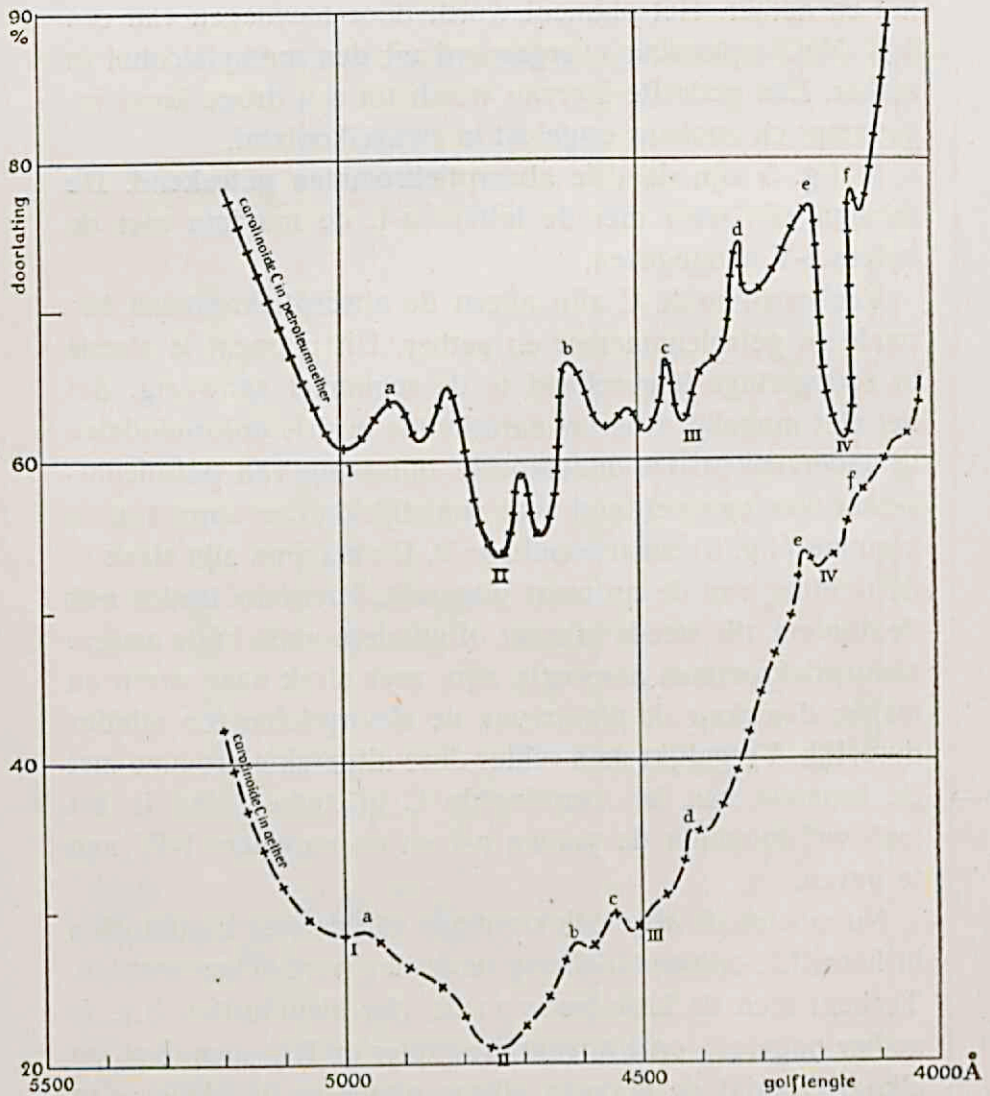
In fig. 5 zijn de drie absorptiekrommen geteekend. De minima zijn weer met de letters a-f, de maxima met de cijfers I-V aangegeven.

Van carotinoïde C zijn alleen de absorptiekrommen bepaald in petroleumaether en aether. Dit pigment is steeds in zoo geringe hoeveelheid in de schimmel aanwezig, dat het niet mogelijk was het carotinoïde in drie oplosmiddelen te onderzoeken. De onderzochte oplossing van petroleum-aether was zeer verdund, wat duidelijk uit den vorm van de kromme (fig. 6) waarneembaar is. De maxima zijn sterk in de richting van de ordinaat uitgerekt. Hierdoor treden ook de minima, die steeds in meer of mindere mate in de andere absorptiekrommen aanwezig zijn, zeer sterk naar voren en maken daardoor de plaats van de absorptiebanden minder duidelijk. Vergelijkt men echter deze uitgerekte kromme met de kromme van het carotinoïde C in aether, dan is het toch wel mogelijk de punten a-f en de nummers I-IV aan te geven.

Nu moeten de absorptiekrommen van de vier kleurstoffen in hetzelfde oplosmiddel nog onderling vergeleken worden. Teekent men de krommen van de vier kleurstoffen b.v. in aether opgelost, op transparant papier en legt men deze op elkaar, zoodat de maxima elkaar ongeveer bedekken, dan merkt men op, dat de vorm van de krommen zeer veel gelijkenis vertoont, dat steeds dezelfde maxima en minima terugkeren, wat er op wijst, dat de stoffen zeer nauw verwant zijn.

Teekent men de absorptiekrommen van de verschillende carotinoïden in hetzelfde oplosmiddel onder elkaar, dan is

FIG. 6.



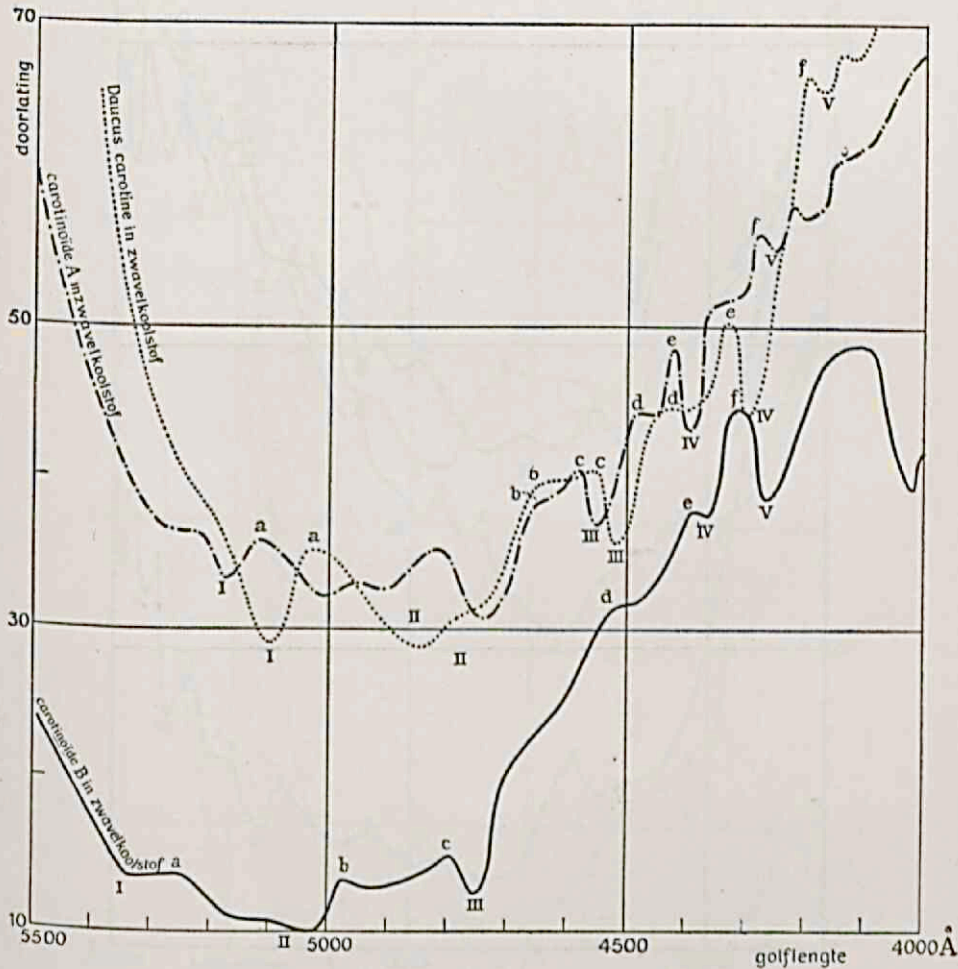
een bandverschuiving waar te nemen, en wel het duidelijkst als de pigmenten in zwavelkoolstof opgelost zijn.

Lubimenko (1927) heeft er ook op gewezen, dat

zwavelkoolstof het beste oplosmiddel is voor het bepalen van de absorptiebanden van de carotinoïden. In oplosmiddelen met lagere brekingsindex verschuiven de banden sterk naar het violet en wordt het verschil in ligging veel minder duidelijk.

In fig. 7, 8 en 9 zijn de absorptiekrommen geteekend

FIG. 7.



van Daucuscarotine en de schimmelpigmenten respectievelijk opgelost in: zwavelkoolstof, aether en petroleumaether.

drie schimmelcarotinoïden ten opzichte van die van Daucuscarotine naar het roode deel van het spectrum. Het minst verschuiven de banden van carotinoïde A, dan die van carotinoïde B en het meest die van carotinoïde C.

Om duidelijk de verschuiving te doen uitkomen volgen hieronder drie tabellen, waarop de plaats van de punten a-f in de drie oplosmiddelen aangegeven is.

TABEL I

Oplosmiddel: zwavelkoolstof				
Daucuscarotine		Carotinoïde A	Carotinoïde B	Carotinoïde C
λ		λ	λ	
a	5035 Å	5120 Å	5250 Å	—
b	4650 "	4660 "	4980 "	—
c	4555 "	4585 "	4800 "	—
d	4440 "	4485 "	4520 "	—
e	4330 "	4425 "	4400 "	—
f	4200 "	4285 "	4325 "	—

TABEL II

Oplosmiddel: aether				
Daucuscarotine		Carotinoïde A	Carotinoïde B	Carotinoïde C
λ		λ	λ	λ
a	4650 Å	4775 Å	4820 Å	4960 Å
b	4365 "	4420 "	4520 "	4620 "
c	4300 "	4285 "	4450 "	4550 "
d	4225 "	4200 "	4335 "	4420 "
e	4170 "	4120 "	4205 "	4225 "
f	4065 "	4075 "	4120 "	4135 "

TABEL III

Oplosmiddel: petroleumaether				
Daucuscarotine		Carotinoïde A	Carotinoïde B	Carotinoïde C
λ		λ		λ
a	4660 Å	4820 Å	—	4910 Å
b	4365 „	4485 „	—	4620 „
c	4285 „	4365 „	—	4455 „
d	4230 „	4255 „	—	4325 „
e	4155 „	4205 „	—	4205 „
f	4030 „	4075 „	—	4140 „

Carotinoïde A komt in zijn chemische eigenschappen overeen met Daucuscarotine (zie hoofdstuk III), maar daar zijn absorptiespectrum een weinig afwijkend is, zal ik het schimmelpigment toch carotinoïde A blijven noemen.

Carotinoïde B is meer naar het roode deel van het spectrum verschoven dan carotinoïde A. In zijn gedrag ten opzichte van het twee fasen-systeem petroleumaether-alcohol komt carotinoïde B vrijwel overeen met het door L u b i m e n k o (1927) gevonden xanthocarotine. L u b i m e n k o vindt voor dit pigment twee absorptiebanden in zwavelkoolstof, band I komt overeen met die van xanthophyl, band II met die van carotine. Hij geeft de volgende metingen voor de absorptiebanden:

	Band I	Band II	Band III
Xanthophyl in CS ₂	520-500	480-462	450-440
Xanthocarotine „	530-500	490-472	-
Carotine „	538-510	492-475	-

Daar van carotinoïde B alle banden ten opzichte van die van carotine naar het roode deel verschoven zijn, is het schimmelpigment dus niet identiek met xanthocarotine en zal ik het carotinoïde B blijven noemen.

Carotinoïde C is het meest naar het roode deel van het spectrum verschoven. Wat zijn chemische eigenschappen betreft, komt carotinoïde C overeen met lycopine (zie hoofdstuk III).

E s c h e r (1909) heeft van lycopine de absorptiebanden bepaald in alcohol en geeft twee metingen op (in $\mu\mu$), de eerste voor een minder en de tweede voor een meer geconcentreerde oplossing.

Oplosmiddel	Band I	Band II	Band III
alcohol	510-499	480-468	440-
„	511-498	480-469	445-

C o w a r d (1924) heeft de absorptiebanden gemeten van lycopine, opgelost in petroleumaether.

Oplosmiddel	Band I	Band II	Band III
petroleumaether	509-492	479-461	447-435

Vergelijkt men de opgaven van E s c h e r en C o w a r d met elkaar dan ziet men, dat de banden volgens E s c h e r een weinig meer naar het roode deel van het spectrum liggen.

De maxima I en III van carotinoïde C, opgelost in petroleumaether, komen goed overeen met de absorptiebanden I en III van lycopine volgens de opgave van C o w a r d. Het maximum II van carotinoïde C ligt een weinig meer naar het roode deel van het spectrum dan band II van lycopine. Men moet echter bedenken, dat de metingen van C o w a r d verkregen zijn met een spectroscop en dat hiermee niet zonder meer de juiste plaats van de banden aan te geven is. Zeer waarschijnlijk is carotinoïde C dus identiek met lycopine, maar daar ik hiervoor geen absolute zekerheid heb, zal ik het schimmelpigment toch carotinoïde C blijven noemen.

Het in dit hoofdstuk beschreven onderzoek werd verricht in het Fysisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht. Prof. Dr. L. S. Ornstein dank ik op deze plaats ten zeerste voor zijn hulp en tevens voor de bereidwilligheid, waarmede hij mij toestond van de apparaten gebruik te maken.

HOOFDSTUK V.

De invloed van lucht op de vorming van de kleurstoffen en van de conidiën.

§ 1. De invloed van den luchttoevoer op de kleurstofvorming.

Neurospora sitophila werd hoofdzakelijk in glazen cultuurdoozen met deksels met ingeslepen rand (zie pag. 9) gekweekt. Soms moest ik, wanneer ik veel schimmelmateriaal tegelijk nodig had, ook nog gebruik maken van doozen met deksels met overhangenden rand. In de eerstgenoemde doozen vormde de schimmel prachtig hoog wit luchtmycelium als de cultures in het donker gestaan hadden. In de doozen met deksels met overhangenden rand groeide de schimmel ook heel goed, vormde wit luchtmycelium, maar wanneer dit een eind tegen den opstaanden kant van de doos gegroeid was, vertoonden zich hiertusschen kleine groepjes conidiën. Deze laatste zijn in het allereerste ontwikkelingsstadium wit, maar al heel spoedig worden ze rose, dan oranje-rose en tenslotte fel oranje. Hierin heeft dus, zonder aanwezigheid van licht, kleurstofvorming plaats.

De doozen met de deksels met overhangenden rand zijn veel minder goed gesloten dan die met deksels met ingeslepen rand, waardoor dus een verschil ontstaat in de toetreding van de lucht. Indien inderdaad deze vrijere toetreding van belang is voor de kleurstofvorming, dan zal de schimmel, als men het deksel van de doos er gedurende eenige uren afneemt, wat betreft den luchttoevoer, onder nog betere voorwaarden zijn dan in de slecht sluitende doozen.

Opent men de goed gesloten doos en laat men deze steeds onder afsluiting van licht staan, dan is er als de doos na 5 uur gesloten wordt, geen kleurstofvorming in het lucht-mycelium waar te nemen. De kans, dat de schimmel door het langdurig geopend zijn van de doos geïnfecteerd wordt, is voor *Neurospora* niet groot.

Na een dag is er tusschen het mycelium een begin van vorming van conidiën waar te nemen, die zich snel rose kleuren. Het mycelium is echter nog steeds kleurloos gebleven. De vrije toetreding van de lucht heeft dus niet ten gevolge gehad, dat zich zonder licht kleurstof vormde in het lucht-mycelium. Hiervoor moet dus steeds de factor licht aanwezig zijn.

Nu is het de vraag of er pigmentvorming mogelijk is bij aanwezigheid van licht als de cultuurdoos van de lucht afgesloten wordt. Om dit te onderzoeken werd de rand van de goedsluitende doos met vaseline ingesmeerd en na het enten op de doos geplaatst, zoodat toetreding van de lucht niet meer mogelijk was. Gedurende zes dagen werd de doos in het duister bewaard. In dezen tijd was de schimmel vrij goed gegroeid, wel minder dan in een niet zoo goed gesloten doos, maar er had zich nog tamelijk veel wit lucht-mycelium gevormd. De cultuur werd nu in diffuus daglicht gebracht, maar na eenige dagen had zich in het geheel geen kleurstof gevormd.

Het licht alleen is dus niet voldoende om de kleurstof te vormen; er moet ook voldoende luchttoevoer plaats hebben.

Ook in de literatuur vond ik eenige opgaven, die er op wijzen, dat er voor de vorming van enkele roode schimmel-kleurstoffen voldoende luchttoevoer moet zijn. L a b o r d e (1896) vermeldt, dat de kleurstofvorming in *Eurotiosis Gayoni* bij zwakke luchttoetreding en op vloeibare media gering was. Na rijkelijken toevoer van lucht werd er snel kleurstof gevormd. B e s s e y (1904) vond, dat voor de vorming

van de roode kleurstof van eenige soorten van *Fusarium* en *Neocosmospora* zuurstof onmisbaar is. Op vloeibare media vormt de kleurstof zich slechts in het oppervlakkig gelegen deel van het mycelium. Door Hibino (1925) is bij *Monascus purpureus* waargenomen, dat in anaerobiontische cultures de kleurstofvorming zeer verminderd was. Het gelukte hem echter niet een volkomen kleurlooze cultuur te verkrijgen. Zeker is het echter, dat zuurstof belangrijk is voor de pigmentvorming.

Evenals Bessy (1904) vond ik ook, dat op de vloeibare mout alleen de bovenste laag van het mycelium kleurstof bevatte; lagen, die zich in de mout bevonden bleven ongekleurd. Nam ik het myceliumdek, wat meestal vrij dik was, uit de voedingsoplossing en legde ik het met de ongekleurde zijde naar boven, dan vormde zich hierin heel spoedig kleurstof.

§ 2. De invloed van verschillende gassen op de kleurstofvorming.

Van belang was het nu na te gaan of de zuurstof bij de aanwezigheid van licht noodzakelijk is voor de kleurstofvorming van *Neurospora*. Went (1901 a) vermeldt, dat deze schimmel anaerobiontisch leven kan. Werd de schimmel geënt in cultuurbuisjes en deze gebracht in wijdere Buchnersche buizen, waarin zich pyrogallol en kaliloog bevonden en het geheel goed afgesloten van de lucht, dan had er normale ontwikkeling plaats. Dit was ook het geval, wanneer de culturen zich in dozen onder een glazen klok bevonden, waarin de lucht door waterstof verdrongen en dit gas van tijd tot tijd vernieuwd werd. Het uitstroomende waterstofgas bevatte koolzuur. Wel maakte het den indruk, dat de ontwikkeling van de schimmel geringer is, naarmate de zuurstof beter verdreven is. Niet vermeld wordt of de kleurstofvorming vermindert of ophoudt. Bessy (1904) onderzocht bij eenige soorten van *Fusarium* en *Neocosmo-*

spora den invloed van zuurstof en andere gassen op de vorming van de oranje kleurstof. Van deze kleurstof kon slechts vastgesteld worden, dat het geen chromolipoïde was. Geen kleurstof werd gevormd in een atmosfeer van waterstof of koolzuur; zuurstof is dus voor de vorming van het oranje pigment noodzakelijk. Naumann (1912) werkte met *Epicoccum purpurascens*, een schimmel met een rood pigment van een onbekende chemische samenstelling. Voor de vorming van dit pigment is zuurstof absoluut noodzakelijk. Dit leidde hij af uit de volgende feiten: 1. de schimmel vormt bij submersen groei nooit pigment; 2. door quantitatief uitschakelen van de zuurstof gelukte het de kleurstofvorming zoowel als den groei te onderdrukken, zonder daardoor de schimmel te doden, b.v. in een atmosfeer van koolzuur; 3. door de aanwezigheid van sporen zuurstof treedt zoowel groei als pigmentvorming op, n.l. in een atmosfeer van waterstof en stikstof, waaruit de zuurstof zoo veel mogelijk door pyrogallol verwijderd is.

Om den invloed van verschillende gassen na te gaan, werd *Neurospora* in Erlenmeyer kolven van 300 c.c., waarin zich vloeibare mout bevond, geënt. De kolven waren gesloten door een dubbel doorboorde gummistop, waarin zich een glazen in- en afvoerbuisje bevonden. Bij het inleiden van koolzuur werd de toevoerbuis lang, de afvoerbuis daarentegen kort genomen. Juist het omgekeerde geschiedde bij de doorvoering van lichtere gassen. Onderzocht werden: koolzuur, waterstof en stikstof.

1°. De invloed van het koolzuur.

In een Kipptoestel werd uit marmer en zoutzuur koolzuur ontwikkeld en dit gas werd door een waschfleschje met gedistilleerd water in de kolf geleid, waarin de schimmel geënt was. Nadat het koolzuur gedurende een paar uur doorgeleid was, werden de toe- en afvoerbuizen, die capillair uitgetrokken waren, toegesmolten. Na 6 dagen was geen groei waar te nemen. Om te controleeren of de schimmel

nog leefde, werd de gummistop er afgenomen en de kolf met een wattenprop gesloten. Na een paar dagen trad groei en in het licht kleurstofvorming op.

Om nu vast te kunnen stellen of in een atmosfeer van koolzuur kleurstofvorming mogelijk is, werd het gas in een kolf geleid, waarin zich reeds hoog wit luchtmycelium gevormd had. Gedurende eenige uren werd onder afsluiting van licht koolzuur doorgevoerd. Nadat de toe- en afvoerbuis afgesmolten waren, werd de kolf in diffuus daglicht geplaatst. Na een paar dagen was absoluut geen kleurstofvorming opgetreden. In een atmosfeer van koolzuur is dus geen pigmentvorming mogelijk.

Werd de gummistop nu vervangen door een wattenprop, dan was na eenige uren in diffuus daglicht nog geen rose kleuring waar te nemen. Dit is wel steeds het geval bij een schimmel, die onder normale omstandigheden in het donker gekweekt is en dan in het licht geplaatst wordt. Na 24 uur trad in de kolf, waarin zich koolzuur had bevonden, begin van kleurstofvorming op en na eenigen tijd was de kleuring heel normaal. Het duurt dus tamelijk lang, voordat de schimmel zich hersteld heeft en weer in staat is pigment te vormen.

2°. De invloed van de waterstof.

De waterstof werd in een Kipptoestel ontwikkeld uit zink en zwavelzuur. Het gas werd geleid door waschfleschjes met sublimaat, kaliumpermanganaat, alkalische pyrogalloloplossing en gedistilleerd water. Nadat alle lucht uit de kolf, waarin zich de geënte schimmel bevond, verdreven was, werden de toe- en afvoerbuisjes dichtgesmolten. Na 6 dagen was het geënte stukje mycelium een weinig uitgegroeid. Dit uitgroeien wijst op minimale aanwezigheid van zuurstof.

Of kleurstofvorming in een atmosfeer van waterstof mogelijk is, kan vastgesteld worden, door het gas te leiden door een kolf, waarin zich reeds hoog wit luchtmycelium bevindt, dat van het licht afgesloten is. In een atmosfeer

van waterstof blijft de schimmel, na plaatsing in diffuus daglicht, kleurloos. Na opening van de kolf is na een dag begin van kleurstofvorming waar te nemen.

3°. De invloed van de stikstof.

Om een koolzuurvrije en zooveel mogelijk zuurstofvrije atmosfeer te verkrijgen, werd een stikstofbom gebruikt. Deze bevat volgens de Boer (1928) een gas, bestaande uit bijna 98 % stikstof en ruim 2 % zuurstof. De stikstof werd geleid door waschfleschjes met alkalische pyrogallol-oplossing en gedistilleerd water. Gedurende eenige uren werd de stikstof door de kolf geleid, waarin het mycelium geënt was, en daarna werden de toe- en afvoerbuisjes dichtgesmolten. Na eenige dagen was duidelijk groei waar te nemen, en zelfs vormde zich wat luchtmycelium, dat zich bij aanwezigheid van licht heel zwak kleurde, maar na eenige dagen niet in kleurintensiteit was toegenomen. Deze kleurstofvorming was zoo gering, dat deze slechts duidelijk waarneembaar was, als het luchtmycelium uit de kolf werd gehaald en eenige lagen op elkaar gelegd werden. Vergelijkt men dit met absoluut kleurloos mycelium, dan is wel eenig verschil te bespeuren. Den nog betrekkelijk goeden groei bracht ik op rekening van de bij de stikstof nog aanwezige zuurstof.

Werd nu, onder afsluiting van licht, door een kolf, waarin reeds wit luchtmycelium gevormd was, gedurende eenige uren stikstof geleid en werd na afsmelting van de toe- en afvoerbuisjes deze kolf in diffuus daglicht geplaatst, dan vormde zich ook een zeer geringe hoeveelheid kleurstof, die niet in sterkte toenam. Ook deze kleuring was eerst na vergelijking met geheel kleurloos mycelium waar te nemen. De geringe hoeveelheid zuurstof bij de stikstof was dus blijkbaar in staat een heel zwakke kleurstofvorming teweeg te brengen.

Onverklaarbaar leek me aanvankelijk nog, waarom geen kleurstofvorming plaats had in de schimmel, die zich ont-

wikkeld had in een glazen cultuurdoos, die geheel van de lucht afgesloten was, en wel in de schimmel, die gegroeid was in een atmosfeer van stikstof, die $\pm 2\%$ zuurstof bevatte. De schimmel heeft voor zijn groei zuurstof nodig, wat blijkt uit het uitblijven van groei in een atmosfeer van koolzuur en uit den zeer geringen groei in een atmosfeer van waterstof, waar slechts sporen zuurstof aanwezig zijn. In de kolf, waarin stikstof met een klein percentage zuurstof geleid was, had eenige ontwikkeling plaats, die ophield, nadat blijkbaar alle zuurstof opgebruikt was. De schimmel, die in de afgesloten doos geënt was, kon aanvankelijk groeien in een atmosfeer, waarin $\pm 20\%$ zuurstof aanwezig was, welk percentage tijdens den groei daalde. De ontwikkeling was vrij goed en hield eerst op, nadat alle zuurstof verbruikt was. Het leek me nu eerst niet goed verklaarbaar, waarom zich, bij aanwezigheid van licht, wel een geringe hoeveelheid kleurstof vormde in de schimmel, die in de kolf met een atmosfeer van stikstof gegroeid was en niet in de afgesloten doos, daar in beide de zuurstof wel geheel, of nagenoeg geheel, opgebruikt zal zijn. Dit zou alleen te verklaren zijn, als ook de kleurstofvorming bij afwezigheid van zuurstof onder invloed stond van het aanwezige koolzuur. In de kolf groeit de schimmel van het begin af in een atmosfeer met weinig zuurstof, hoogstens 2% . De Boer (1928) vond voor *Phycomyces*, gekweekt op zetmeelmedia, dat bij aanwezigheid van 2% zuurstof de koolzuurafgifte tot 50% van de normale werd gereduceerd, terwijl bij 1% zuurstof de afgifte slechts 40% was. Ook in een veel oudere publicatie van Dixon (1886) wordt vermeld, dat de CO_2 -afgifte door *Penicillium* en *Aspergillus*, gekweekt op suikermmedia, bij afwezigheid van zuurstof, tot een vierde verminderd is.

Er mag dus wel verondersteld worden, dat ook de koolzuurafgifte van *Neurospora*, in de kolf met zeer kleine zuurstofspanning belangrijk afgenomen zal zijn en door het

weinige mycelium zal de hoeveelheid gevormd koolzuur niet groot zijn. In de doos daarentegen heeft in het begin normale ademhaling plaats; langzamerhand zal bij daling van het zuurstofgehalte de koolzuurafgifte verminderen. Er wordt tamelijk veel mycelium gevormd, dus de hoeveelheid aanwezig koolzuur zal tenslotte vrij groot zijn. Wanneer inderdaad het koolzuur bij afwezigheid van zuurstof de kleurstofvorming tegengaat, moet deze wel in geringe mate optreden, als het koolzuur geabsorbeerd wordt door kaliloog. Daarom plaatste ik in een doos een bakje met sterke kaliloog en sloot de doos van de lucht af. Nadat de schimmel zich ontwikkeld had en geen verdere groei meer optrad, werd de cultuur in diffuus daglicht geplaatst. Na eenigen tijd had er werkelijk een zeer geringe kleurstofvorming plaats, die niet in sterkte toenam.

Inderdaad schijnt dus bij afwezigheid van zuurstof de aanwezigheid van een bepaalde hoeveelheid koolzuur remmend op de kleurstofvorming te werken. Wordt deze werking opgeheven, dan is zonder zuurstof een zeer geringe kleurstofvorming mogelijk.

Ook de andere proeven, waarbij de verschillende gassen over goed gegroeide cultures geleid werden, stemmen hier goed mee overeen. In een atmosfeer van koolzuur is geen pigmentvorming mogelijk. In een atmosfeer van waterstof met sporen van zuurstof zal de koolzuurafgifte gering zijn. Daar er echter in de kolf een groote hoeveelheid luchtmycelium aanwezig is, is de hoeveelheid gevormd koolzuur blijkbaar toch nog te groot, en de eerst nog aanwezige zuurstof te klein, om kleurstofvorming mogelijk te maken. De schimmel in de kolf met een atmosfeer van stikstof, vermengd met $\pm 2\%$ zuurstof, heeft een belangrijke vermindering in zijn koolzuurafgifte. Door de eerst nog aanwezige zuurstof schijnt de schimmel in staat te zijn toch nog eenige kleurstof te vormen.

Om echter precies uit te kunnen maken, bij welke hoe-

veelheid koolzuur bij afwezigheid van zuurstof nog juist eenige kleurstofvorming mogelijk is, zou eerst nauwkeurig de ademhaling van *Neurospora* bekend moeten zijn.

§ 3. De invloed van lucht op de conidiënvorming.

In § 1 wees ik er reeds op, dat conidiën zonder aanwezigheid van licht oranje kleurstoffen kunnen vormen, waartoe het mycelium nooit in staat is. In het volgend hoofdstuk zal ik bespreken, hoe ik getracht heb na te gaan of er verband bestaat tusschen de hoeveelheid licht en de hoeveelheid gevormde kleurstof. Hiervoor was het echter noodig, dat ik steeds met cultures werkte, die geen conidiën vormden, daar deze onafhankelijk van licht hun intensief oranje kleur aannemen. Het was dus noodzakelijk vast te stellen door welke factoren de conidiënvorming beïnvloed wordt.

Went (1901 a) vermeldt, dat de conidiënvorming van *Neurospora sitophila* sterk onder invloed staat van de vochtigheid en toont dat voor een drietal gevallen aan. In het warme en vochtige klimaat van Java groeide de schimmel zoo welig, dat de conidiën zich buiten de wattenprop of de glazen schalen vertoonden. Voorts vormden zich in verdunde voedingsoplossingen veel conidiën, terwijl ze in geconcentreerde oplossingen bijna niet aanwezig waren, wat waarschijnlijk te wijten is aan de geringe dampspanning boven deze laatste. In een kolf, waarover laboratoriumlucht streek, vormden zich tamelijk veel conidiën, de conidiënvorming was echter veel grooter als de lucht eerst door water gevoerd werd. Werd de lucht echter eerst over chloorcalcium geleid, dan vormde zich krachtig ondergedoken mycelium, maar er was geen spoor van conidiën waar te nemen. Het ontbreken van de conidiën aan het ondergedoken mycelium zou niet geweten moeten worden aan de zuurstofonttrekking, daar in anaerobe schimmelculturen in een atmosfeer van stikstof wel conidiën gevormd werden.

Indien ik de cultuurkolven en doozen met deksels met ingeslepen rand, zoowel als die met deksels met overhangenden rand, waarin zich gelijke hoeveelheden vloeibare mout bevonden, na het enten in een zeer vochtige ruimte plaatste bij een temperatuur van $\pm 30^\circ$, dan was inderdaad na enkele dagen de schimmel uit de wattenprop en de doozen gegroeid en hadden zich hier buiten rijkelijk conidiën ontwikkeld. Dit trad op zoowel in doozen met deksel met ingeslepen rand, als in die met deksel met overhangenden rand. Liet ik de doozen en kolven na het enten staan in de laboratoriumlucht, die veel minder vochtig was, dan groeide het mycelium niet naar buiten en vormden zich conidiën in de kolven en in de slecht sluitende doozen. In de goed sluitende doozen had zich alleen hoog luchtmycelium gevormd, terwijl men door het beter sluiten, en dus grootere vochtigheid, hier eerder conidiën in zou verwachten. Bracht ik nu in eenige goed sluitende doozen bakjes met calciumchloride, in andere bakjes met water, dan traden in de eerste conidiën op, vooral rondom de chloorcalcium, terwijl in de tweede slechts luchtmycelium gevormd werd. Dit nam ik waar zoowel bij vloeibare mout, als bij moutagar als voedingsbodem. Voorts verkreeg ik bij verhoogde concentratie van de voedingsoplossing (zie pag. 8) steeds conidiënvorming. Hieruit ziet men dus, dat conidiënvorming plaats heeft bij afname van de luchtvochtigheid. Ditzelfde werd voor een soort van *Botytris* gevonden door Link, Ramsey en Bailey (1924). Ook het tegenovergestelde komt voor bij soorten van *Sclerotinia*, door Molz (1907), Schellenberg (1907) en Barss (1923) waargenomen. Hier treedt conidiënvorming vooral in vochtige lucht op.

In de cultures, die zich in een atmosfeer van koolzuur, waterstof of stikstof bevonden, of in doozen, die door het bestrijken van de deksel met vaseline geheel van de lucht afgesloten waren, zag ik nooit conidiënvorming optreden. Voor die vorming is zuurstof noodzakelijk. Door extra toe-

voer van lucht b.v. door het wegnemen van het deksel gedurende eenige uren, vormden zich zeer veel conidiën. Het optreden van de conidiën buiten de cultuurdoozen en buizen in een vochtigewarme atmosfeer is dus een gevolg van den grooten luchttoevoer. Luchtvochtigheid schijnt dus bij dien grooteren luchttoevoer de conidiënvorming niet tegen te werken. Ik controleerde het nog eens door een doos zonder deksel na enting op een bak met water te plaatsen en hierover een klok te zetten. Er vormde zich hoog luchtmycelium, dat snel over den rand van de doos groeide naar den bak met water. Vochtige lucht bevordert zeer de groeisnelheid van het mycelium; dit is ook door K u n k e l (1914) waargenomen. Onderaan het mycelium vormden zich talrijke conidiën; de vorming hiervan wordt dus niet in vochtige lucht tegengewerkt.

Ook in zeer droge atmosfeer heeft bij rijkelijke aanwezigheid van zuurstof conidiënvorming plaats. Dit is gemakkelijk waar te nemen, als men de doos, waarin het mycelium geënt is, zonder deksel in een exsiccator plaatst. Het mycelium blijft laag, maar er vormen zich talrijke conidiën. Zelfs kan men in deze zeer droge atmosfeer het mycelium, dat in vloeibare mout gegroeid is, zonder voedingsbodem tot conidiënvorming brengen. Wordt het myceliumdek na afspoelen met water en drogen tusschen filtreerpapier in den exsiccator gelegd, dan vormen zich na korten tijd zeer veel conidiën.

Bij rijkelijken zuurstoftoevoer heeft dus zoowel in droge als in vochtige atmosfeer conidiënvorming plaats.

HOOFDSTUK VI.

De invloed van licht op de kleurstofvorming.

§ 1. De invloed van diffuus daglicht op de vorming van de kleurstoffen.

Reeds verschillende malen heb ik er op gewezen, dat *Neurospora sitophila* in het donker gekweekt kleurloos is en in het licht oranje gekleurd wordt. Dit is opgemerkt door Went (1901 b, 1904) en reeds in de inleiding besproken. In de literatuur zijn verschillende gevallen bekend, waar carotine en enkele onbekende schimmelpigmenten onder invloed van het licht gevormd worden.

Reeds Elfving (1882) deelde mee, dat bij geëtioloerde planten de carotine (spreekt nog van etioline) zich in het licht vermeerderde, wanneer de chlorophylvorming door verlaging van temperatuur onderdrukt werd. Kohl (1902) bevestigde deze mededeeling, maar vond, dat ook zonder medewerking van licht carotine gevormd kon worden. Bessy (1904) vindt, dat de oranje kleurstof van eenige soorten van *Fusarium* en *Neocosmospora*, die niet tot de chromolipoiden behoort, slechts onder invloed van het licht gevormd kan worden. Willstätter en Stoll (1913) vermelden groote schommelingen in carotinvorming in licht- en schaduwbladen. Uit een bijgevoegde tabel volgt, dat er meer carotine gevormd wordt in lichtbladen. Lipman (1924) verkreeg de omzetting van chloroplasten in chromoplasten in geïsoleerde bladfragmenten van *Reseda odorata* op saccharose-oplossingen. De roode kleurstof van de chromoplasten is een carotinoïde; licht schijnt voor de

vorming onontbeerlijk te zijn. In 1925 heeft L i p p m a a dit onderzoek verder voortgezet en vond, dat de roode kleuring van de bladen veroorzaakt wordt door het zich vormende rhodoxanthine, een carotinoïde. Bij cultures in het donker verliep het proces van de chromoplastenvorming, wat chlorophyl, xanthophyl en carotine betreft, bijna evenals bij cultures in het licht. Daarentegen waren de gevormde hoeveelheden rhodoxanthine minimaal en bedroegen gemiddeld ca. $\frac{1}{5}$ van de gelijktijdig in het licht gevormde hoeveelheden. D a n i l o v (1925) vermeldt, dat cultures van *Isaria virescens* in het donker kleurloos waren, terwijl in daglicht de chromolipoïden optraden, waardoor de schimmel van rose tot oranjerood gekleurd werd. C h o d a t e n M a y e r (1927) merkten op, dat de carotine in eenige algen in het licht toenam.

Het mycelium van *Neurospora* maakt, als het zich in het donker ontwikkeld heeft, een absoluut kleurlozen indruk. Toch vond ik na extraheeren met methylalcoholische petroleumaether, dat deze lichtgeel gekleurd werd, wat er dus op wijst, dat er zonder licht toch nog een weinig kleurstoffen gevormd worden.

Reeds een zeer korte belichting door diffuus daglicht deed de hoeveelheid kleurstoffen toenemen. Werkte het licht langer op de schimmel in, dan nam de vorming van de pigmenten toe. Dit deed vermoeden, dat er een verband bestaat tusschen de toename van de hoeveelheid licht en de toename van de hoeveelheid kleurstoffen. Om hier echter nader op in te kunnen gaan, was het noodig, dat met een elektrische lichtbron gewerkt werd.

§ 2. Belichting van de schimmel met een elektrische lichtbron.

Als lichtbron werd genomen een elektrische daglichtlamp, die in een cilindervormig glazen vat gehangen werd, waarin voortdurend water stroomde om de lamp te koelen, daar

anders een te groote temperatuursverhooging op zou treden. De schimmel werd gekweekt in de glazen doozen met deksels met ingeslepen rand in 20 c.c. vloeibare mout, zooals aangegeven is op pag. 9. Hierin vormde zich in het donker hoog wit luchtmycelium zonder conidiën.

Om de intensiteit van het licht, waarmee de schimmels bestraald werden, te meten, werden eerst met een photo-electrische cel, die op de plaats van de cultuurdoozen gezet was, de relatieve lichteenheden gemeten. Om nu deze laatste uit te drukken in absolute waarden ($\text{erg/cm}^2 \text{ sec}$) is later de uitslag van de photocel vergeleken met den galvanometeruitslag van een absoluut geijkte thermozuil bij gebruik van dezelfde lichtbron. Bij deze meting was tusschen de lichtbron en de thermozuil, respectievelijk de photocel, kopersulfaat en 2 c.M. water tusschengeschakeld. Het bleek uit deze vergelijkingsmeting, dat de schimmels in het zichtbare deel van het spectrum (CuSO_4) door ongeveer $88,6 \text{ erg/cm}^2 \text{ sec}$. belicht werden.

Twaalf doozen werden voor de belichting rondom het cylindervormige vat geplaatst, zoodat het licht onder een hoek van 60° in de doozen viel. Eerst werden gelijke belichtingstijden genomen om uit te kunnen maken of de gevormde hoeveelheid kleurstof in het luchtmycelium van alle doozen even groot was. Daar de kleurstof zich eerst langzamerhand vormt, werden bij alle proeven de cultures na de belichting gedurende 24 uur in het donker gezet en daarna werd het luchtmycelium pas geoogst en behandeld op de op pag. 10 beschreven wijze. De kleur van het gedroogde poeder, afkomstig uit de verschillende doozen, werd vergeleken. De poeders varieerden aanzienlijk in kleurintensiteit. Om te controleren, of inderdaad de hoeveelheden gevormde kleurstoffen aanmerkelijk verschilden, extraheerde ik de verschillende poeders volgens de gegeven methode en vergeleek de verkregen extracten colorimetrisch (zie pag. 30). Inderdaad was er een belangrijk verschil waar te ne-

men; het bleek, dat dit aan de gedroogde poeders heel goed te constateeren was. Deze proeven werden verschillende malen herhaald, ook met andere belichtingstijden, maar steeds werden betrekkelijk groote afwijkingen waargenomen. Deze afwijkingen meende ik voor een groot deel te moeten toeschrijven aan het feit, dat het licht niet loodrecht inviel, waardoor het mycelium niet geheel gelijkmatig belicht werd. Het beste zou zijn, als de doozen op hun kant gezet en dan op gelijke hoogte rondom de lamp geplaatst konden worden, zoodat het licht loodrecht inviel. Door den vloeibaren voedingsbodem is dit echter niet mogelijk.

Een andere oplossing werd verkregen door in een grooten ronden aquariumbak met een diameter van 50 c.M. 3 lampen te hangen en deze ook weer voortdurend met stroomend water te koelen. De bak werd op een ijzeren ring geplaatst, die bevestigd was aan een ijzeren driepoot. Hierdoor was het dus mogelijk onder den bak de doozen op 12 c.M. afstand te zetten. De drie lampen waren zoodanig geplaatst, dat ze de hoekpunten van een gelijkzijdigen driehoek vormden. De bodem van den bak was van vrij goed glas, zoodat het den indruk maakte, dat de belichting heel gelijkmatig was.

Op dezelfde wijze als genoemd op pag. 67 werd de intensiteit bepaald. Per lamp werden de schimmels door 130,6 erg/c.M.² sec. belicht. Tusschen twee lampen in was de lichtintensiteit 20 % minder, zoodat slechts drie doozen tegelijk belicht konden worden, wat een bezwaar is van deze manier van belichting. Iedere doos vormde een hoeveelheid luchtmycelium, dat gemiddeld slechts 70 m.G. aan droge stof opleverde, terwijl voor het colorimetrisch bepalen van de kleurstoffen van minstens 200 m.G. droge stof uitgegaan moet worden, daar voor zeer kleine hoeveelheden de methode niet nauwkeurig genoeg is.

Nu de belichting van de doozen dus heel gelijkmatig was, bepaalde ik eerst, of op deze wijze de hoeveelheid ge-

vormde kleurstof bij gelijken belichtingstijd even groot was. Verschillende groepen van drie doozen werden belicht en ook nu werden weer verschillen waargenomen. Wat kon de oorzaak van deze ongelijkheid zijn? Zou het te wijten zijn aan den ongelijkmatigen groei van het mycelium, zoodat de dichter op elkaar gegroeide myceliumdraden minder licht ontvingen dan de los van elkaar liggende draden? Op pag. 9 heb ik er reeds op gewezen, dat ik een zoo gelijkmatig mogelijken groei trachtte te verkrijgen, door het entstukje van ongeveer gelijke grootte in het midden te enten. Toch kan men niet voorkomen, dat er dichte en minder dichte plekken luchtmycelium gevormd worden. Bovendien krijgt het mycelium, dat zich dicht bij het deksel bevindt, ook meer licht, dan hetgeen vlak bij den bodem is, daar de lichtintensiteit omgekeerd evenredig is met het quadraat van den afstand. Om deze fouten uit te kunnen schakelen en een dunne laag mycelium te kunnen belichten, trachtte ik het mycelium tegen een glazen plaat op te laten groeien, wat echter niet gelukte. Moest de conidiënvorming bij de belichtingsproeven niet uitgeschakeld worden, dan zou misschien mogelijk zijn het ongekleurde luchtmycelium tusschen twee glazen plaatjes te leggen en dan te belichten. Haalt men het luchtmycelium echter uit de cultuurdoozen, dan krijgt het zulk een vermeerderden luchttoevoer, dat zich conidiën beginnen te vormen.

Mogelijk ligt de ongelijkheid van kleurstofvorming ook aan den niet overal even grooten luchttoevoer in de doozen. In hoofdstuk V besprak ik den grooten invloed, dien de zuurstof heeft op de kleurstofvorming. Daar niet alle doozen precies even goed zullen sluiten, trachtte ik deze ongelijkheid uit te schakelen, door het deksel met vaseline in te smeren en dus geheel van de lucht af te sluiten. Voor den luchttoevoer werd midden in het deksel een opening gemaakt van 1 m.M. diameter. Na het enten groeide het mycelium nu niet langs den opstaanden kant van de doos; pre-

cies onder de opening vormde zich een weinig luchtmycelium, wat echter veel te gering was om mee verder te werken. Ten slotte probeerde ik nog gelijken luchttoevoer te verkrijgen, door in den rand van den opstaanden kant van de glazen doos op gelijke afstanden zeer ondiepe inhammen te maken. Het resultaat was, dat zich precies onder de openingen kleine groepjes conidiën vormden; deze manier van kweeken was dus niet bruikbaar.

Het gelukte mij dus niet, de ongelijkheid in groei en luchttoevoer uit te schakelen, maar toch wilde ik trachten eenig inzicht te krijgen over den invloed van verschillende hoeveelheden licht op de kleurstofvorming. De kleurstoffen werden niet colorimetrisch bepaald, daar de uitkomsten te ongelijk waren om ze in getallen vast te kunnen leggen. Aan de kleur van het poeder was de meer of mindere hoeveelheid gevormde kleurstof heel goed te schatten en voorts konden de poeders vergeleken worden met de „Code des couleurs”.

§ 3. De invloed van continue belichting met een electrische lichtbron op de kleurstofvorming.

De verschillende belichtingstijden werden tamelijk uiteenlopend genomen om duidelijke verschillen waar te kunnen nemen. Ik begon met korte belichtingstijden en nam telkens drie doozen, die ik 5, 10, 15, of 30 min. belichtte. Daar de kleurstof zich eerst langzamerhand vormt, werden, zooals ik reeds opmerkte, bij alle proeven de cultures na de belichting gedurende 24 uur in het donker gezet, terwijl daarna pas het luchtmycelium geoogst werd.

Vervolgens verlengde ik de belichtingstijden tot 1, 2, 3, 4, 6, of 8 uur, om ten slotte zelfs 20 of 24 uur te belichten. Na al deze belichtingen was heel duidelijk waar te nemen, dat er geen regelmatige vermeerdering van de kleurstoffen had plaats gehad. De meeste toename werd waargenomen, als de schimmel, die in het donker gegroeid was, aan een

zeer korte belichting b.v. van 5 min. werd blootgesteld; het luchtmycelium werd dan van wit, lichtroze gekleurd. Na langere belichting werd de toename steeds geringer, om dan na eenige uren belichting weer te stijgen. Wordt deze toename grafisch voorgesteld, dan krijgt men dus een golfvormig verloop. Door den onregelmatigen groei is niet precies vast te stellen na welke belichtingstijden de meeste vermeerdering plaats heeft. Door de vele proeven heb ik zelf een algemeen indruk over de kleurstoftoename gekregen, maar deze is niet exact genoeg om in getallen vast te leggen.

Behalve de onregelmatige toename trad ook wel na langere belichting een afname op. Heel goed denkbaar is, dat het licht, dat verschillende stoffen om kan zetten in de carotinoïden, ook tot het omgekeerde in staat is en dat bij bepaalde belichtingstijden deze laatste splitsing tijdelijk overheerscht.

Het golfvormige verloop van de vermeerdering van de kleurstoffen hoort misschien thuis onder de verschijnselen, die Plotnikow (1928) periodische lichtverschijnselen noemt. De verschijnselen ontstaan door de gelijktijdige inwerking van licht van verschillende golflengten. Ze zijn echter nog zeer weinig onderzocht, slechts enkele gevallen in de chemie zijn beschreven en Koningsberger (1922) heeft ze waargenomen bij den plantengroei. Een karakteristiek verschijnsel voor de lichtgroei-reactie is het golfvormige verloop, wat bij monochromatisch licht niet optreedt. Koningsberger meent, dat de oorzaak van dit golfvormig verloop niet, of tenminste niet uitsluitend, in de plant, maar in de samengestelde natuur van het witte licht gezocht moet worden. Plotnikow zegt hierover: „Es müssen in der Pflanze ein oder mehrere Faktoren vorhanden sein, die bei Strahleneinwirkung entweder periodisch auftreten und verschwinden oder unter der Einwirkung verschiedener Wellenlängen zu verschiedenen Zeiten auftre-

ten und auf diese Weise das periodische Wachstum d.h. das intermittierend verlaufende Anhäufen der chemischen Stoffe verursachen".

Om uit te kunnen maken of het golfvormige verloop van de kleurstofvermeerdering werkelijk geheel of gedeeltelijk ontstaat door de inwerking van het samengestelde licht, zou de schimmel aan verschillende hoeveelheden monochromatisch licht blootgesteld moeten worden. Zoolang echter de groei in de doozen zoo onregelmatig is en niet elke myceliumdraad evenveel licht en zuurstof krijgt, heeft het voorloopig geen nut hier verder op in te gaan.

§ 4. De invloed van intermitterende belichting met een electrische lichtbron op de kleurstofvorming.

Terwijl ik bezig was met de in de vorige § genoemde belichtingsproeven, is het één maal gebeurd, dat tijdens het belichten door een defect aan het stopcontact de belichting onderbroken moest worden. De cultures waren slechts 10 min. belicht en het duurde eenigen tijd, voordat de overige 50 minuten licht gegeven konden worden. Na het drogen bleek, dat deze groep schimmelmycelium, die in twee gedeelten belicht was, aanmerkelijk meer kleurstof gevormd had, dan de overige groepen, die een uur continu belicht waren. Dit bracht mij op het denkbeeld, dat intermitterende belichting misschien heel gunstig op de kleurstofvorming zou werken. Heel goed mogelijk is, dat tijdens het duisternisinterval, dat op het lichtinterval volgt, omzettingen plaats vinden, die de volgende lichtwerkingen bevorderen. Door Plotnikow (1928) wordt er ook zeer nadrukkelijk op gewezen, dat bij intermitterende belichting bij vele processen niet de eenvoudige „Lichtsummenregel" geldt. Hij zegt o.a.: „Bei physiologischen Prozessen verstärkt sich die Dunkelwirkung dadurch, dass bei ihnen noch das Hinzudiffundieren oder Hinzuströmen der Reaktionskomponenten hinzukommt, die während der Dunkelpause an die Belich-

tungsstelle herankommen und den Stoffwechsel beeinflussen".

Bij de continue belichtingsproeven vond ik, dat na zeer korten belichtingstijd reeds tamelijk veel kleurstof gevormd werd. Als belichtingsinterval werd 5 minuten genomen, het duisternisinterval nam ik veel groter, 1 uur, en ik belichtte driemaal. Na deze intermitterende belichting was de hoeveelheid gevormde kleurstof aanzienlijk groter dan na 15 minuten continue belichting. Werden langere belichtingsintervallen van 10 of 15 minuten en de duisternisintervallen weer van een uur genomen, dan was de hoeveelheid gevormde kleurstof na drie maal 10 of drie maal 15 minuten belichting even groot als na drie maal 5 minuten. Er schijnt dus slechts een betrekkelijk kleine hoeveelheid licht noodig te zijn om het kleurstofvormingsproces in gang te zetten. De grotere hoeveelheid licht oefent dan geen verderen invloed hierop uit.

Nu is het nog van belang om na te gaan, of de duur van de duisternisintervallen van beteekenis is. Verschillende duisternisintervallen werden beproefd en wel $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1 of 2 uur. Het belichtingsinterval was steeds 5 minuten. Was er nu driemaal 5 minuten belicht en als duisternisinterval tweemaal $\frac{1}{4}$ uur genomen, dan bleek bij het oogsten na 24 uur, dat er minder kleurstof gevormd was, dan in het mycelium, dat 2 duisternisintervallen van 1 uur had gehad tusschen de belichtingsintervallen van 5 minuten. Ook bij 2 duisternisintervallen van $\frac{1}{2}$ uur was de hoeveelheid kleurstof nog iets minder dan met 2 van 1 uur. Werden de duisternisintervallen langer dan 1 uur, n.l. 2 uur, genomen, dan was er evenveel kleurstof gevormd als met die van 1 uur. Men ziet hier dus uit, dat de grootste hoeveelheid kleurstof gevormd wordt, als na iedere belichting den stoffen, waaruit de kleurstoffen gevormd worden, een bepaalde tijd wordt gegeven om zich om te zetten. Één uur duisternisinterval is reeds voldoende, en toch blijkt, dat, als het myce-

lium direct na het eerste duisternisinterval van 1 uur geogst wordt, er nog absoluut geen kleurstof gevormd is. Wordt direct na het eerste duisternisinterval van 2 uur geogst, dan is pigmentvorming waar te nemen. Om het licht weer verdere eenvoudige stoffen te doen omzetten, schijnt het dus niet noodzakelijk te zijn, dat het geheele omzettingsproces tot de vorming van de kleurstoffen afge-loopen is. Waarschijnlijk worden uit eenvoudige stoffen in de schimmel eerst tussenstoffen gevormd, voordat de kleurstoffen ontstaan. Nu is het heel goed denkbaar, dat na een duisternisinterval de tussenstoffen gevormd zijn en dat er opnieuw genoeg eenvoudige stoffen aanwezig zijn om het omzettingsproces bij de belichting weer in gang te zetten.

Men krijgt wel den indruk, dat het licht met intermitteerende belichting veel meer benut wordt dan met continue belichting. Dit zou dan nog een andere verklaring kunnen geven voor het golfvormig verloop van de kleurstof-toename bij continue belichting. Als er inderdaad slechts een kleine hoeveelheid licht nodig is, die het omzettingsproces in gang zet, en tijdens dit proces het meerdere aangevoerde licht van weinig of geen beteekenis is, dan zal men bij continue belichting een periodisch verloop van de kleurstoftoename verkrijgen.

§ 5. De vorming van de kleurstoffen bij licht van verschillende golflengten.

Zooals ik reeds in de inleiding vermeldde, is door W e n t (1901 b, 1904) waargenomen, dat de schimmelkleurstof van *Neurospora* niet door alle deelen van het samengestelde licht gevormd wordt. Dit werd gevonden door de cultures onder klokken van S a c h s te plaatsen; één ervan bevatte een oplossing van dubbelchroomzurekalium, een tweede een oplossing van koperoxydammoniak en een derde een oplossing van zwavelzure chinine. De cultuur onder de eerste

klok, die roode, oranje en gele stralen doorlaat, werd niet gekleurd. Onder de tweede klok, die blauw licht doorlaat, werd de cultuur wel gekleurd, evenals onder de derde, die het ultraviolette licht absorbeert. Deze laatste proef bewijst dus, dat de kleurstofvorming niet alleen onder invloed van het ultraviolette licht gevormd wordt, maar dat ook, of uitsluitend, aan de zichtbare stralen met kleine golflengten deze werking toekomt.

Een twintigtal jaren voor W e n t ' s onderzoek was door E l f v i n g (1882) juist gevonden, dat slechts de zwakker breekbare stralen in staat zouden zijn carotine (etioline) in kiemplanten te vormen. Zelf wees hij er echter op, dat zijn methode te grof was, om met zekerheid uit te kunnen maken, of er in het blauwe en violette licht absoluut geen vorming van gele kleurstof plaats heeft.

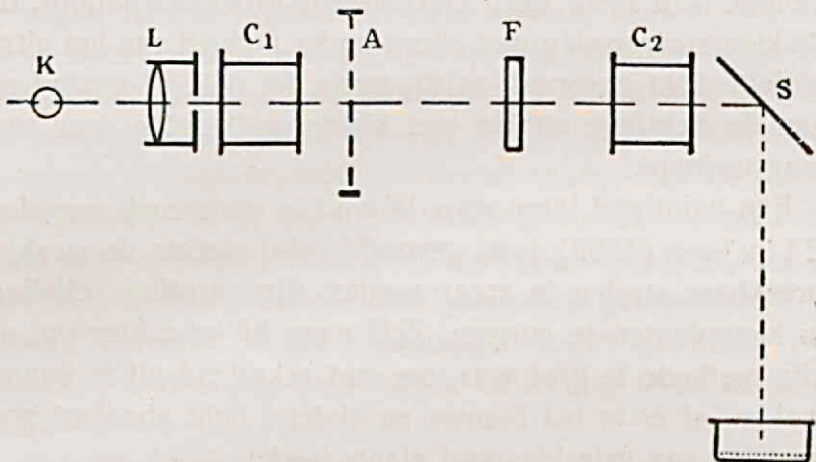
B e s s e y (1904) vermeldt, dat de werkzame stralen voor de vorming van het oranje pigment van de soorten van *Fusarium* en *Neocosmospora*, die van de blauwe spectrum-helft zijn. D a n i l o v (1925) nam waar, dat het oranje-roode pigment van *Isaria virescens* door het blauwe licht snel gevormd wordt; in het gele en het groene licht is de vorming veel langzamer en in het roode licht is er in het geheel geen, of hoogstens een zwakke rose kleuring.

C h o d a t e n M a y e r (1927) vermelden, dat *Chlorella rubescens* in totaal licht (d.w.z. achter een venster) vlugger carotine vormt dan achter klokken van S e n e b i e r; de minste kleurstof wordt gevormd achter een oplossing van kopersulfaat. Men krijgt hierdoor den indruk, dat het uiterste roode deel van het spectrum en misschien ook het infrarood de carotinevorming bevordert. Belichtingsproeven met genoemde klokken zijn echter te grof, dan dat men hieruit een conclusie kan trekken.

Voor het onderzoek, bij welke golflengten van het licht kleurstofvorming in *Neurospora sitophila* plaats heeft, werd dezelfde proefopstelling gebruikt als N u e r n b e r g k e n

du Buy (1930) voor hun phototropische onderzoeken bezigden.

FIG. 10.



Als lichtbron werd de kwiklamp K (fig. 10) gebruikt, het licht hiervan gaat door de collectorlens L en de cuvet C_1 , gevuld met een oplossing van kopersulfaat (6 %, 1 c.M.), waardoor de infrarode en uiterste zichtbare roode stralen geabsorbeerd worden. Is de sluiters A geopend, dan passeert het licht een glazen Schottfilter F en de cuvet C_2 , gevuld met een oplossing van zoutzure chinine (2 gram in 100 c.c. N.HCl, 1 c.M.), waardoor het ultraviolette licht en λ 405 geabsorbeerd worden, en valt dan op den spiegel S, die een hoek van 45° maakt met het horizontale vlak, waarop de cultuurdoozen geplaatst zijn, waardoor het licht hierop loodrecht invalt. De intensiteit van het licht wordt in $\text{erg}/\text{c.M}^2$, met behulp van een geijekte thermozuil en een galvanometer gemeten. Deze waarde moet verminderd worden met 10 %, daar door reflectie van de glazen deksels van de cultuurdoozen 10 % van het licht verloren gaat. Deze 10 % is niet afgetrokken van de waarde na de intensiteitsmeting bij λ 366. Bij deze belichting waren de deksels van de doozen genomen, daar het ultraviolette licht anders te veel geabsorbeerd zou worden.

Voor het verkrijgen van zuiver monochromatisch licht zijn Schottfilters gebruikt, in combinatie met de cuvetten met de oplossing van kopersulfaat en zoutzure chinine. Deze laatste oplossing werd verwijderd bij het gebruik van de filters

TABEL IV

No. en dikte v/h filter	Doorgelaten λ in μ	Deel v/h spectrum waarin de doorgelaten λ ligt	Intensi- teit in erg/c.M ²	Belich- tingstijd in sec.	Licht- hoeveel- heid in erg (c.M ² sec.)	Kleur v/h gedroogde mycelium en nummers volgens Code d. couleurs
OG2 (2 m.M.)	578	geel	3,17	150	428	kleurloos
"	"	"	44,1	900	36690	"
"	"	"	92,9	3600	300600	"
OG1 (2 m.M.) + BG11 (15 m.M.)	546	groen	3,77	150	509	"
"	"	"	45,3	900	36680	"
"	"	"	116	3600	376020	"
BG4 (2 m.M.)	436	blauw	4,87	150	583	"
"	"	"	19,47	900	15770	licht-oranje 121
"	"	"	29,25	3600	94770	rood-oranje 86
UG2 (2 m.M.)	405 en 366	violet en ultraviolet	5,64	150	761	kleurloos
"	"	"	22,56	900	16866	zeer licht- oranje $\pm$ 146
"	"	"	17,00	5400	82620	lichtrood- oranje 91
UG2 (3 m.M.) + GG12 (0,5 m.M.)	366	ultraviolet	1,91	12600	24000	zeer licht- oranje $\pm$ 146

UG₂ en UG₂ + GG₁₂, daar hierdoor de golflengte 366 passeert, die in het ultraviolette deel van het spectrum ligt. In tabel IV wordt aangegeven, bij welke golflengten en licht-hoeveelheid kleurstofvorming plaats heeft.

Uit tabel IV ziet men, dat bij λ 578 en λ 546 geen kleurstofvorming plaats heeft. Bij λ 436, λ 405 + λ 366 en λ 366 heeft wel pigmentvorming plaats, als de energie niet te klein is, zooals het geval was bij de beide eerste metingen bij λ 436 en λ 405 + λ 366.

Bij λ 366 was het niet mogelijk een groote intensiteit te verkrijgen, vandaar dat de belichtingstijd heel lang genomen is. De kleurstofvorming was nog wel gering, maar toch voldoende om te constateeren, dat ze ook in het ultraviolet plaats heeft.

Voor het roode deel van het spectrum werd niet de kwiklamp als lichtbron gebruikt, daar hiervoor de intensiteit te klein is, maar een Philips bioscoopgloeilamp, die in tegenstelling met het lijnenspectrum van de kwiklamp een continu spectrum geeft. Door de Schottfilter wordt nu ook niet één enkele golflengte, maar een deel van het roode spectrum doorgelaten van 700—600 (grootste doorlating van 620—610).

TABEL V

No. en dikte v/h filter	Doorgelaten λ	Deel v/h spectrum waarin de doorgelaten λ ligt	Intensi- teit in erg/c.M ²	Belich- tingstijd in sec.	Licht- hoeveel- heid in erg (c.M ² sec.)	Kleur v/h gedroogde mycelium en nummers volgens Code d. couleurs
RG1 (2 m.M.)	700—600	rood	12,56	7200	81540	kleurloos
"	"	"	4,85	10800	47115	"
BG4 (2 m.M.)	510—405	blauw	17,04	7200	110430	rood-oranje 86

Met de bioscooplamp werd bovendien nagegaan, of ook bij andere golflengten in het blauwe deel, meer naar het groene deel van het spectrum, kleurstof gevormd wordt; doorgelaten worden λ 510—405 (grootste doorlating 450—440).

Uit tabel V ziet men, dat in het roode deel van het spectrum (700—600) geen kleurstof gevormd wordt. Bovendien blijkt, dat in het blauw ook bij λ 510— λ 405 rijkelijke pigmentvorming optreedt.

Samenvatting.

De oranje kleur, die de cultures van *Neurospora sitophila*, in het licht geplaatst, aannemen, wordt gevormd door drie carotinoïden, die carotinoïde A, B en C genoemd zijn.

Tijdens het zoeken naar een geschikten voedingsbodem voor de schimmel werd tevens nagegaan, welken invloed concentratieverschillen van maltose- en glucosevoedingsoplossingen op de kleurstofvorming hebben. Deze verschillen zijn van geen invloed op de kleurstofvorming; te hoge concentraties werken door den hoogen osmotischen druk remmend op den groei.

Een methode wordt aangegeven om de drie carotinoïden zoo vlug mogelijk uit het schimmelmycelium te extraheeren.

De scheiding van de drie pigmenten geschiedt als volgt: het carotinoïde B is van de carotinoïden A en C door de chromatografische methode van T s w e t t te scheiden. In het systeem CaCO_3 -petroleumaether wordt het carotinoïde B door het calciumcarbonaat geadsorbeerd en kan, daar carotinoïde A en C niet geadsorbeerd worden, van deze gemakkelijk gescheiden worden. In het systeem watten-petroleumaether wordt uit het mengsel carotinoïde A en C slechts het laatste geadsorbeerd, waardoor het gemakkelijk van carotinoïde A te scheiden is. Door methylalcohol wordt carotinoïde B uit CaCO_3 en carotinoïde C uit de watten vrijgemaakt.

Voor het scheiden van de carotinoïden A en C is de uitschudmethode niet bruikbaar. De carotinoïden A en C gedragen zich ten opzichte van het systeem petroleumaether-alcohol steeds epiphasisch; het carotinoïde B daarentegen is niet uitgesproken hypophasisch, bij het uitschudden gaat steeds een deel in de petroleumaether over.

Het is niet gelukt de drie carotinoïden te doen uitkristalliseeren.

Met een spectrograaf is een fotografie gemaakt van de absorptiespectra van Daucuscarotine opgelost in petroleum-aether en zwavelkoolstof, van carotinoïde A in petroleum-aether en van carotinoïde B in methylalcohol. Op de fotografie is verschuiving van de absorptiebanden naar het roode deel van het spectrum van carotinoïde A en B ten opzichte van die van Daucuscarotine duidelijk zichtbaar.

Quantitatief zijn de absorptiespectra bepaald met een monochromator. Eerst werd met dezen laatste vastgesteld, dat concentratieverschillen van Daucuscarotine opgelost in aether geen bandverschuiving teweegbrengen. Absorptiekrommen zijn gegeven van Daucuscarotine, carotinoïde A, B en C opgelost in zwavelkoolstof, aether, petroleumaether en methylalcohol. Hieruit blijkt, dat de absorptiebanden van de drie carotinoïden ten opzichte van die van Daucuscarotine naar het roode deel van het spectrum verschoven zijn, het minst die van carotinoïde A, het meest die van carotinoïde C. De ligging van de absorptiebanden van carotinoïde A en B komt niet overeen met die van reeds bekende carotinoïden. Zeer waarschijnlijk is carotinoïde C identiek met lycopine.

Voor de normale kleurstofvorming is zuurstof noodzakelijk. Bij afwezigheid van zuurstof is bij een zeer laag koolzuurgehalte een zeer geringe pigmentvorming mogelijk.

Conidiënvorming wordt bevorderd door rijkelijken zuurstoftoevoer, zoowel in droge als in vochtige atmosfeer; in niet goed doorgeluchte cultures treedt alleen in zeer droge atmosfeer conidiënvorming op.

Conidiën vormen steeds pigment ook zonder aanwezigheid van licht. Hiermee dient dus rekening gehouden te worden, als men den invloed van het licht op de kleurstofvorming in de schimmel onderzoekt.

Cultures van *N. sitophila*, die in het donker gegroeid zijn,

hebben voor het oog kleurloos mycelium. Na extractie blijkt dit mycelium toch nog een geringe hoeveelheid kleurstoffen te bevatten.

Bij continue belichting met licht van een electriche lichtbron heeft de toename van de hoeveelheden kleurstoffen een golfvormig verloop. Gedurende langere continue belichting komt het voor, dat er kleurstofafname plaats heeft.

Intermitteerende belichting werkt gunstig op de kleurstofvorming, vooral wanneer de duisternisintervallen niet te kort genomen zijn.

Met monochromatisch licht is onderzocht, bij welke golflengten kleurstofvorming plaats heeft. Geen kleurstoffen worden gevormd in het roode, gele en groene deel van het spectrum; kleurstofvorming treedt op in het blauwe, violette en ultraviolette deel.

LITERATUUR.

- Barss, H. P., Brown rot and related diseases of stone fruits in Oregon.
1923, Oregon Agr. Coll. Exp. Stat. Circ. 53.
- Bessey, E. A., Ueber die Bedingungen der Farbbildung bei Fusarium.
1904, Flora 93.
- Boer, S. R. de, Respiration of Phycomyces.
1928, Rec. des trav. bot. néerl. vol. XXV.
- Cittert, P. H. van, Un monochromateur de grande luminosité et avec peu de lumière diffuse.
1923, Revue d'optique théorique et instrumentale, 2, 57—60.
- Chodat, R. et Mayer, F. L., Sur les conditions de la formation de la carotine chez les algues en culture pure.
1927, Compte rendu Soc. Phys. et Hist. nat., Genève 44, 2.
- Chodat, R. et Schopfer, W. H., Carotine et sexualité.
1927, Compte rendu Soc. Phys. et Hist. nat., Genève 44, 3.
- Coward, K. H., Some observations on the extraction and estimation of lipochromes from animal and plant tissues.
1924, Biochem. journ. vol. 18.
- Czapek, Biochemie der Pflanzen.
1913, 2. Auflage. Jena.
1922, 3. Auflage. Jena.
- Danilov, A. N., Zur Frage nach der Pigmentbildung bei den Pilzen.
1925, Ber. der deutsch. bot. Ges., Bd. XLIII.

- Diakonow, N. W., Intramolekulare Athmung und Gährthätigkeit der Schimmelpilze.
1886, Ber. der deutsch. Bot. Ges. Bd. IV.
- Elfving, Fr., Ueber eine Beziehung zwischen Licht und Etiolin.
1882, Arb. des Bot. Inst. in Würzburg, II.
- Escher, H. H., Zur Kenntnis des Carotins und des Lycopins.
1909, Zürich. Polytechnikum, Diss.
- Goerrig, E., Vergleichende Untersuchungen über den Carotin- und Xanthophyllgehalt grüner und herbstlich gelber Blätter.
1918, Beih. bot. Centralbl. XXXV, 1.
- Goppelsroeder, Fr., Capillaranalyse, beruhend auf Capillaritäts- und Adsorptionserscheinungen.
1901, Verh. der Naturf. Gesellschaft, Basel Bd. XIV.
- Hibino, S. I., Conditions influencing the production of colouring matter of *Monascus purpureus* Went.
1925, Proc. Kon. Ac., Amsterdam, vol. XXVIII, No. 2.
- Howard, G. E., Pigment studies with special reference to carotinoids in fruits.
1925, Ann. of Missouri Bot. Garden 12, April.
- Karrer, P., Salomon, H. und Wehrli, H., Über einen Carotinoidfarbstoff aus Mais: Zeaxanthin.
1929, Helvetica chim. acta. vol. XII.
- Klincksieck, P. et Valette, T., Code des Couleurs.
1908, Paris.
- Kohl, F. G., Untersuchungen über das Carotin und seine physiologische Bedeutung in der Pflanze.
1902, Leipzig.
- Königsberger, V. J., Tropismus und Wachstum.
1922, Rec. des trav. bot. néerl. vol. XIX.
- Kunkel, L. O., Physical and chemical factors influencing

- the toxicity of inorganic salts to *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc.
1914, Bull. Torrey Bot. Club. XLI.
- Kylin, H., die karotinoiden Farbstoffe der höheren Pflanzen.
1927, Zeitschr. phys. Chem. 163.
- Laborde, M. J., Recherches physiologiques sur une moisissure nouvelle l'Eurotiopsis Gayoni.
1896, thèse Paris. Bordeaux.
- Link, G. K. K., Ramsey, G. B., and Bailey, A. A., Botrytis rot of the globe artichoke.
1924, Journ. of Agric. Research, vol. 29.
- Lippmaa, Th., Über den Parallelismus im Auftreten der Karotine und Anthocyanine in vegetativen Pflanzenorganen.
1924, Sitzungsber. der Naturf. Ges. bei der Univ. Dorpat. Bd. XXX, 3—4.
- , Das Rhodoxanthin, seine Eigenschaften, Bildungsbedingungen und seine Funktion in der Pflanze.
1925, Schriften herausg. v. d. Naturf. Ges. bei der Univ. Tartu, XXIV.
- Lubimenko, V., Les pigments des plantes et leur transformation dans les tissus vivants de la plante.
1927, Rev. Gén. Bot. 39.
- Molisch, H., Die Krystallisation und der Nachweis des Xanthophylls (Carotins) im Blatte.
1896, Ber. der deutsch. Bot. Ges. Bd. XIV.
- Moll, W. J. H. and Burger, H. C., The sensitivity of a galvanometer and its amplification.
1925, Philosophical Mag. Vol. 1 Sept.
- Molz, E. J., Über die Bedingungen der Entstehung der durch *Sclerotinia fructigena* erzeugten „Schwarzfäule“ der Äpfel.
1907, Centr.bl. für Bakt. Abt. II, Bd. 17.

- Naumann, C. W., *Epicoccum purpurascens* und die Bedingungen für seine Pigmentbildung.
1912, Hedwigia, Bd. 51.
- Nuernbergk, E., en du Buy, H. G., Methode zur Analyse von Wachstumserscheinungen.
1930, Rec. des Trav. Bot. Néerl.
- Palmer, L. S., Carotinoids and related pigments.
1922, New-York, U. S. A.
- , and Eckles¹⁾, C. H., Carotin—The principal natural yellow pigment of milkfat. Part. II Chemical and physiological relations of pigment of milkfat to the carotin and xanthophylls of green plants.
1914, Missouri, Agr. Exp. Sta. Res. Bull., 10.
- Plotnikow, J., Kurzer Leitfaden der Photochemie.
1928, Leipzig.
- Schellenberg, H. C., Sclerotinia Mespili und Sclerotinia Ariae.
1907, Centr.Bl. für Bakt. Abt. II, Bd. 17.
- Schertz, F. M., Some physical and chemical properties of carotin and the preparation of the pure pigment.
1925 (a), Journ. of Agric. Res. Vol. XXX.
- , Some physical and chemical properties of xanthophyll and the preparation of the pure pigment.
1925 (b), Journ. of Agric. Res. Vol. XXX.
- , The pure pigments, carotin and xanthophyll and the Tswett adsorption method.
1929, Plant Phys. vol. 4, No. 3.
- Shear, C. L. and Dodge, D. O., Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group.
1927, Journ. of Agr. Res. Vol. 34, No. 11.
- Tammes, T., Ueber die Verbreitung des Carotins im Pflanzenreiche.
1900, Flora 87, Heft 2.

¹⁾ Deze literatuur heb ik niet kunnen raadplegen.

- Tswett, M., Zur Kenntnis der Phaeophyceenfarbstoffe.
1906 (a), Ber. d. deutsch. Bot. Ges. XXIV.
- , Physikalisch-chemische Studien über das Chlorophyll. Die Adsorptionen.
1906 (b), Ber. d. deutsch. Bot. Ges. XXIV.
- , Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.
1906 (c), Ber. d. deutsch. Bot. Ges. XXIV.
- , Ueber den makro- und mikrochemischen Nachweis des Carotins.
1911, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. XXIX.
- Went, F. A. F. C., *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc., ein technischer Pilz Javas.
1901 (a), Centr. Bl. für Bakt. Abt. II, Bd. VII.
- , Over den invloed van de voeding op de afscheiding van Enzymen door *Monilia sitophila* (Mont.) Sacc.
1901 (b), 26 Januari, Zittingsversl. d. Kon. Ak. van Wetensch. afd. Wis- en Natuurk. Amsterdam.
- , Ueber den Einfluss des Lichtes auf die Entstehung des Carotins und auf die Zersetzung der Enzyme.
1904, Rec. des trav. bot. néerl. 1.
- Willstätter, R. M., und Stoll, A., Untersuchungen über Chlorophyll; Methoden und Ergebnisse.
1913, Berlin.
- Wisselingh, C. van, Ueber die Nachweisung und das Vorkommen von Carotinoiden in der Pflanze.
1915, Flora 107.
- Zellner, J., Chemie der höheren Pilze, Eine Monographie.
1907, Leipzig.
-

STELLINGEN

I

Rijkelijke zuurstoftoevoer bevordert de conidiënvorming van *Neurospora sitophila*.

II

De theorie van Dixon, dat de neerdalende stroom van de organische stoffen zich beweegt door de houtvaten, die aan de periferie gelegen zijn, is onjuist.

III

Door de onderzoekingen van Jatis Sen-Gupta is het aan-nemelijk geworden, dat rheotropie niet bestaat.

IV

Het is onwaarschijnlijk, dat de conidiën van *Cadophora fastigiata* Lagerberg et Melin endogeen ontstaan.

V

De fungicide werking van Bordeausche pap berust voor-namelijk op het oplossen van koper door excretiestoffen van kiemende sporen.

