



Onderzoeken over het bios-vraagstuk

<https://hdl.handle.net/1874/321190>

av. que 192, 1935

ONDERZOEKINGEN OVER
HET BIOS-VRAAGSTUK

*Beugel
A. H. M. M.*

W. VAN HASSELT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ONDERZOEKINGEN OVER HET BIOS-VRAAGSTUK

Diss. Utrecht 1935

ONDERZOEKINGEN OVER HET BIOS-VRAAGSTUK

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 DR. H. BOLKESTEIN, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 18
MAART 1935 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

WILLEM VAN HASSELT
GEBOREN TE AMSTERDAM

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

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Bij het eindigen van mijn studietijd zij het mij vergund allen dank te zeggen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

In de eerste plaats dank ik U, Hooggeleerde KÖGL, Hooggeachte Promotor, voor het vele, dat ik van U mocht leeren. Steeds hebt Gij mij bij mijn onderzoek met goeden raad ter zijde gestaan, en mij door Uw stuwkracht aangespoord. Een groot voorrecht beschouw ik het Uw assistent te mogen zijn.

Hooggeleerde VAN ROMBURGH, door Uw interessante colleges hebt Gij niet weinig bijgedragen tot mijn enthousiasme voor de studie der organische chemie. Voor de welwillende raadgevingen, die ik tijdens mijn studie van U heb mogen ontvangen, blijf ik U erkentelijk.

Ook U, Hooggeleerde COHEN, ben ik zeer dankbaar voor hetgeen ik onder Uw leiding op het van 't Hoff laboratorium heb mogen leeren.

Hooggeleerde KRUYT, Uw boeiende colleges hebben ten zeerste mijn belangstelling voor de phasenleer en de kolloïdchemie gewekt.

U, Hooggeleerde SCHOORL, dank ik voor het feit, dat Gij mij vertrouwd hebt gemaakt met de micro-chemische analyse. Zelden was ik in de gelegenheid op een cursorisch practicum van slechts korten duur zooveel te leeren.

Hooggeleerde DE GRAAFF, dat Gij mij bekend maaktet met de beginselen der micro-biologie was voor mij van groote waarde bij het bewerken van dit proefschrift. Hiervoor betuig ik U mijn welgemeenden dank.

Zeergeleerde LOBRY DE BRUYN, gedurende de gelegenheden die gij mij boodt op Uw laboratorium werkzaam

te zijn, vormde zich bij mij een warme belangstelling voor de chemische en de chemisch-technische analyse. Ontvang voor Uw gastvrijheid en Uw leiding mijn oprechten dank.

Zeergeleerde TÖNNIS, tallooze malen is Uw groote ervaring op het gebied van het bios-onderzoek mij tot steun geweest. Wees verzekerd, dat ik Uw waardevolle raadgevingen op hoogen prijs heb gesteld.

Zeergeleerde HOOGLAND, voor de hulp, die gij mij verleendet bij het prepareren van een aantal dierlijke organen ben ik U zeer erkentelijk.

Ten slotte wil ik mijn dankbaarheid betuigen aan allen, die mij bij mijn werk op het Organisch Chemisch Laboratorium met raad en daad ter zijde stonden.

INLEIDING.

Bij hogere planten dient men een onderscheid te maken tusschen groei door *celdeeling* en groei door *celstrekking*.

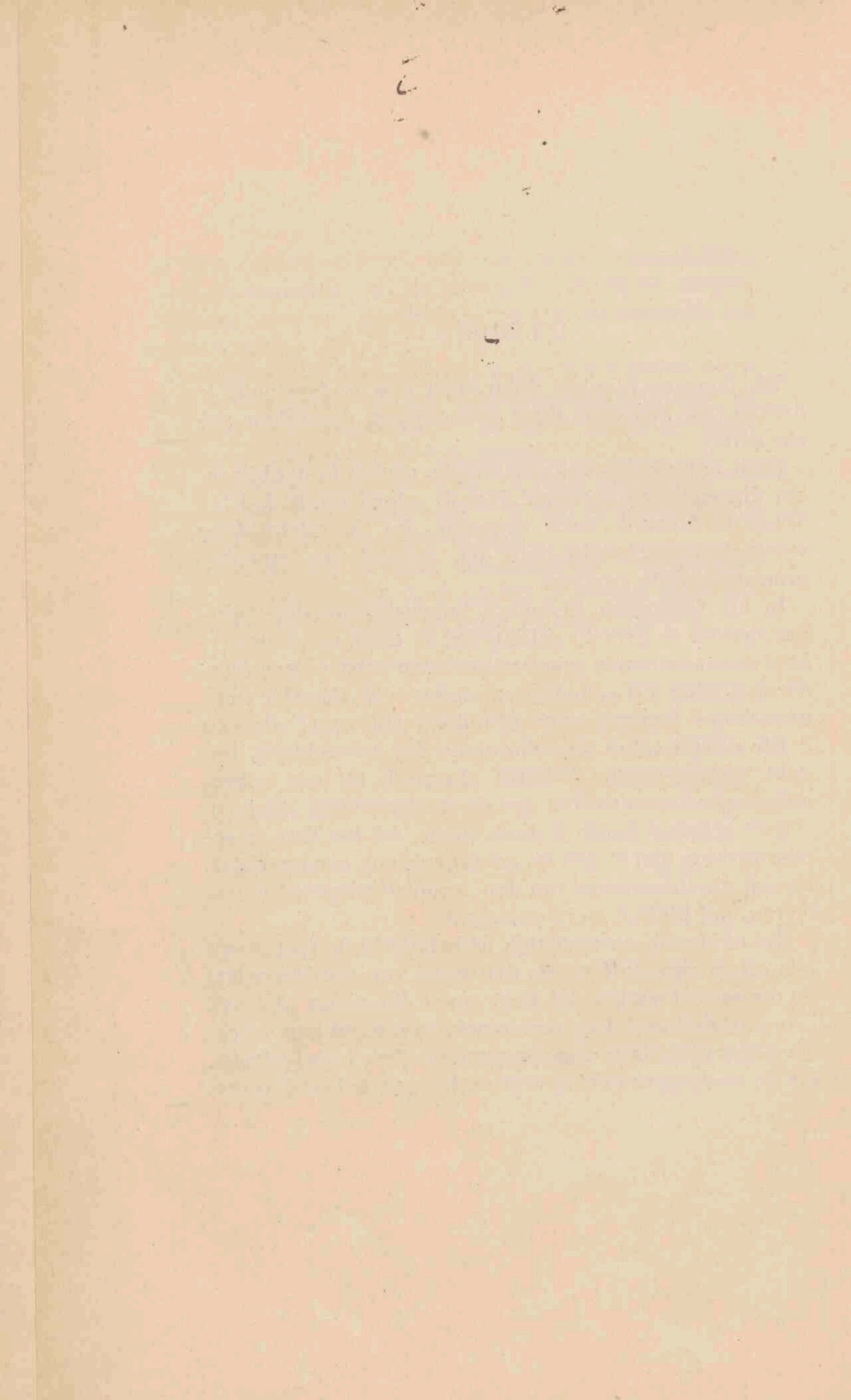
Door botanische onderzoekingen, en wel in het bijzonder die, welke zijn verricht door de school van F. A. F. C. WENT te Utrecht, werd bewezen, dat de *celstrekking* wordt teweeggebracht door den invloed van bepaalde groeistoffen, de auxinen.

In het Organisch Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht gelukte het F. KÖGL en medewerkers deze auxinen in gekristalliseerden vorm te isoleeren. Naast auxine a ($C_{18}H_{32}O_5$) en auxine b ($C_{18}H_{30}O_4$) werd naderhand hetero-auxine (β -indolyl-azijnzuur) als een derde uiterst actief phytohormoon der celstrekking ontdekt. Hetero-auxine behoort chemisch tot een geheel andere groep van stoffen dan de eerstgenoemde auxinen.

Kort geleden deelde F. KÖGL mede, dat het hem in samenwerking met B. TÖNNIS gelukt was ook een gekristalliseerd phytohormoon van den „*celdeelings*groei” te isoleeren, dat biotine werd genoemd.

Het biotine is vermoedelijk de belangrijkste factor van een groep van stoffen, die den groei van gist bevordert en die reeds lang bekend staat onder den naam „*b i o s*”.

In verband met deze onderzoekingen werd aan schrijver dezer dissertatie opgedragen de andere bios-factoren, die de werking van het biotine verhoogen, te bestudeeren.



HOOFDSTUK I.

Historisch overzicht van het bios-vraagstuk.

Het onderzoek naar het bestaan en de samenstelling van bios vindt zijn oorsprong in het werk van PASTEUR en LIEBIG. Het is de verdienste van E. WILDIERS, het bestaan van deze stof door experimenten aannemelijk gemaakt te hebben. De ontdekking van de vitaminen wierp een nieuw licht op de functie van bios, waardoor men opnieuw pogingen deed dit laatste als chemisch gedefinieerde stof te isoleren, hetgeen tot gedeeltelijk succes heeft geleid.

De geschiedenis van het bios-onderzoek kan aldus in twee periodes worden gescheiden. In de eerste vindt men de onderzoekingen, die het aannemen van bios voorbereidden. Tevens vindt men hierin beschreven hoe de juistheid van deze aanname in twijfel werd getrokken en welke critiek zij uitlokte. De tweede periode treedt in na het bekend worden van de vitaminen, waardoor ook het begrip bios werd geaccepteerd. Deze periode onderscheidt zich door betere methodes van onderzoek.

Het hierna volgend overzicht maakt geen aanspraak op volledigheid, doch behandelt slechts die onderzoekingen, welke van beteekenis zijn voor den tegenwoordigen stand van het vraagstuk.

De literatuur tot 1925 is vrijwel volledig besproken door F. W. TANNER (58)¹⁾ in de „Chemical Reviews”. Een

¹⁾ De in dit hoofdstuk tusschen haakjes geplaatste nummers verwijzen naar de hier achter volgende alfabetische lijst van geraadpleegde literatuur.

uitvoerige opsomming van publicaties vindt men ook in KLEIN's „Handbuch der Pflanzenanalyse” (1933). Van de hand van W. LASH MILLER (45) verscheen in 1930 een kort en duidelijk overzicht over bios.

A. *Van de polemiek tusschen Pasteur en Liebig tot de ontdekking der vitaminen.*

In 1860 verscheen de bekende publicatie van PASTEUR (50) getiteld: „Mémoires sur la Fermentation Alcoolique”. Hierin beschrijft hij o.a. proeven met voedingsbodems, die bestonden uit suiker en eenige anorganische zouten, op welke gist en andere organismen zich volgens hem normaal ontwikkelden. Het was hem bekend, dat toevoegen van druiven-, beetwortel- of gistsap de gistingsintensiteit aanzienlijk verhoogt. Zijn waarnemingen konden door verschillende onderzoekers worden bevestigd.

In 1871 protesteerde LIEBIG (38) tegen de opvattingen van PASTEUR. In den strijd over den aard van het gistingsproces, die nu tusschen de twee geleerden ontbrandde, is één twistpunt voor het bios-vraagstuk speciaal van belang. Het gelukte LIEBIG n.l. niet, gist te doen groeien in een voedingsoplossing, welke uitsluitend bestond uit suiker en anorganische zouten, zooals door PASTEUR was aangegeven. Hij beweerde zelfs, dat wat PASTEUR voor gist aanzag, iets anders moest zijn.

Overtuigd van de juistheid van zijn waarnemingen roept laatstgenoemde in zijn antwoord (51) tenslotte uit: „..... Mais comment éclairer le public? Comment sortir de l'embarras que soulèvent ces affirmations contradictoires également honorables? Voici le moyen que j'offre à M. Liebig: il choisira officieusement, dans le sein de

l'Académie, un ou plusieurs de ses Membres, en leur demandant de se prononcer entre lui et moi. En leur présence, et avec des substances que M. Liebig pourra fournir lui même, je reproduirai les deux expériences capitales dont M. Liebig conteste la vérité. Je préparerai, dans un milieu minéral, autant de levûre de bière que M. Liebig pourra raisonnablement en demander, à la condition toutefois qu'il veuille bien faire la dépense des expériences. S'il le désire même et toujours à cette condition, je pourrai préparer quelques kilogrammes de chair de vibrions, dont tout le carbone, tout l'azote, tout le soufre, tout le phosphore, toutes les matières grasses, cellulosiques et autres, sortiront exclusivement d'un milieu à principes minéraux cristallisables et de la matière organique fermentescible...."

LIEBIG antwoordde hierop niet; PASTEUR's opvattingen zegevierden en het is zeker aan zijn autoriteit toe te schrijven, dat bovengenoemd vraagstuk, hetwelk natuurlijk geenszins als opgelost kon worden beschouwd, pas dertig jaar later weder te voorschijn kwam.

In 1901 maakte E. WILDIERS (61) uit Leuven toebereidselen voor een onderzoek naar de phosphorhoudende organische verbindingen in gist. Tot zijn verbazing wilde deze, alle voorzorgsmaatregelen ten spijt, op een synthetischen voedingsbodem niet groeien. WILDIERS entte met een cultuur van *Saccharomyces cerevisiae* I (HANSEN) op steriele mout. Hij gebruikte hiervan aanvankelijk zeer kleine hoeveelheden, om de hoeveelheid onbekende organische stoffen in zijn gistkolven zooveel mogelijk te beperken. Hij constateerde, dat bij enten met een grootere hoeveelheid gist-suspensie wél groei optrad en bewees, dat dit effect niet was te danken aan het grooter aantal

gistcellen, maar aan de grootere hoeveelheid mout. Ook een steriel gistextract veroorzaakte het zelfde effect.

Uit deze simpele waarnemingen concludeerde WILDIERS, dat een gistcultuur, behalve suiker en anorganische zouten, nog minimale hoeveelheden van „iets anders” noodig had, dat blijkbaar aanwezig was in mout en in gistextract. Hij doopte deze stof met den naam *bios* en veronderstelde, dat zij onmisbaar zou zijn voor *alle* gistsoorten.

Het geschilpunt tusschen LIEBIG en PASTEUR verklaarde WILDIERS door aan te nemen, dat PASTEUR met dusdanig groote hoeveelheden gistcultuur entte, dat daarmee genoeg bios in de voedingsoplossing werd gebracht om normale ontwikkeling mogelijk te maken.

Hij deed verder eenige pogingen om bios te identificeren met behulp van de volgende „test”. In kolven, waarin zich een bepaalde hoeveelheid oplossing van suiker en anorganische zouten bevond, bracht hij een zeker quantum van de te onderzoeken stof en een constante hoeveelheid gist. Door deze kolven dagelijks te wegen, bepaalde WILDIERS het gewicht van het ontwikkende koolzuur, en daarmee dus de intensiteit van de gisting.

Op deze wijze kon hij aantonen, dat bios:

- 1°: niet aanwezig is in de asch van gist, en dus een organische stof moet zijn,
- 2°: gemakkelijk door perkamentpapier diffundeert,
- 3°: niet wordt aangegrepen door een half uur koken met 10 % zwavelzuur,
- 4°: schijnbaar verandert door koken met 1 % natriumhydroxyde,
- 5°: niet wordt neergeslagen door loodacetaat, zilvernitraat,

sublimaat, phosphorwolfraam- en phosphormolybdeen-zuur,

6°: onoplosbaar is in aether en absolute alcohol,

7°: niet kan worden vervangen door: ureum, asparagine, aniline, tyrosine, nucleïnezuur, adenine, guanine, creatine, en door pepsine en trypsine afgebroken albumine.

De publicatie van WILDIERS was zijn tijd vooruit. Daarvoor zijn verschillende oorzaken aan te geven. In de eerste plaats gold bij velen nog steeds onbeperkt het gezag van PASTEUR, met wiens zienswijze volgens hen „une nouvelle substance, indispensable pour le développement de la levûre” in flagranten strijd was. In de tweede plaats was over de physiologie van diverse gistsoorten nog betrekkelijk weinig bekend. Bij het bestudeeren van de variabiliteit van de gist zaten waarschijnlijk meer commercieele dan wetenschappelijke belangen voor. In de derde plaats wist men in dien tijd nog niets van vitaminen en hormonen, waardoor zich de bios-hypothese niet van zelf opdrong.

In onzen tijd zou niemand het belang van WILDIERS' publicatie zijn ontgaan. Uit de bezwaren, die men er dertig jaar geleden tegen in bracht, blijkt hoe slecht men de quintessens van bedoelde publicatie begreep. In ieder geval was het niet verwonderlijk, dat WILDIERS' vooruitstrevende denkbeelden van verschillende zijden heftig werden bestreden. Jammer genoeg hebben de meesten van deze bestrijders het bios-probleem niet verder gebracht. Kenmerkend voor de bekrompenheid van hunne critiek is, dat zij wel degelijk de stimuleerende werking van gist-extract, mout, e.d. erkenden, maar het belang van deze waarneming op allerlei manieren trachtten te negeeren. Zoo meden zij zorgvuldig het woord

„bios”, maar spraken b.v. wèl over „een in het bijzonder voor gist geschikte voedingsstof”; WILDIERS had oorspronkelijk niets anders bedoeld. Tot elken prijs bleven deze onderzoekers vasthouden aan de theorieën van PASTEUR. Het eenige wat het vraagstuk tot klaarheid kon brengen was de isolatie van de onbekende stof, maar dit strookte niet met de opvattingen van de aanhangers van PASTEUR. Typeerend is ook, dat hun beweringen soms zelfs niet eens op proeven waren gebaseerd.

Ter toelichting van het bovenstaande volgen hier in het kort eenige bijzonderheden over het werk van WILDIERS' tegenstanders.

A. FERNBACH (19) en W. WINDISCH (74, 75, 76) veronderstelden, dat WILDIERS' voedingsoplossing een giftige stof zou hebben bevat. WINDISCH dacht daarbij in het bijzonder aan de proeven van NÄGELI, die den invloed bestudeerde, dien sporen metaalzout uitoefenen op de ontwikkeling van micro-organismen. In het water zouden o.a. sporen koper voorkomen, die door de eiwitten, aanwezig in het toegevoegde gist-extract, zouden worden gebonden. Bij beide onderzoekers blijft het bij een veronderstelling; vergeefs zoekt men naar een experimenteel bewijs.

T. CHRZASZCZ' (4) resultaten moeten wel op technische fouten berusten. Hij slaagde er in vier verschillende gist-soorten te kweken op een voedingsbodem, bestaande uit suiker en anorganische zouten, opgelost in meerdere malen gedistilleerd water. Nam hij één maal gedistilleerd water, dan groeiden de cellen niet. CHRZASZCZ concludeerde eveneens tot de aanwezigheid van giftige stoffen en ontkende het bestaan van bios.

H. PRINGSHELM (54), een fel tegenstander van de bios-theorie, stelde zich als verklaring van de door WILDIERS waargenomen verschijnselen voor, dat gist in een voedingsbodem, bestaande uit suiker en anorganische zouten, zou moeten acclimatiseeren. Het groeien in een dergelijke op-

lossing zou met een grooteren „Energie-Aufwand” gepaard gaan dan in een organisch milieu. PRINGSHEIM vermoedde, dat bios een in het bijzonder voor gist geschikte eiwit-achtige stof was.

De verschillen, die WILDIERS waarnam bij enten met kleine en groote hoeveelheden gistsuspensie, verklaarde PRINGSHEIM aldus: Bij een groote enting is er meer kans, dat er krachtige cellen zijn, die zich gemakkelijk aan het suiker-zout-milieu kunnen aanpassen en worden door afsterven van cellen, spoedig voedingsstoffen gevormd, die ten goede komen aan een jongere generatie.

PRINGSHEIM vergat, dat WILDIERS bij zijn entingen nooit den nadruk legde op het kleinere of grootere aantal cellen, maar alleen op de met die cellen toegevoegde hoeveelheid mout. Wij merken op, dat de groote verschillen in voortplantingsnelheid bij WILDIERS' proeven nooit gelegen kunnen hebben in het verschil van het aantal geënte cellen. Hij schreef o.m.: „Il est d'ailleurs impossible d'admettre que, si le milieu est réellement suffisant, la marche de la fermentation et du développement puisse différer si fort, suivant qu'on ensemence avec dix milles cellules vivantes, ou avec cinquante milles. Si rien ne manque à ces cellules, c'est tout au plus de quelques heures que les dix milles cellules pourront être en retard sur les cinquante milles . . .”

W. LASH MILLER (45) merkt terecht op, dat WILDIERS voor zijn kleinste entingen minstens een millioen cellen moet hebben gebruikt, waarbij de kans op een tekort aan levenskrachtige individuen practisch is uitgesloten en dat dus hieruit niet de conclusies mogen worden getrokken, die volgen uit proeven bij welke men had geënt met 5 of 50 cellen, zooals b.v. door H. NAUMANN (49) werd beschreven.

Het eenige productieve werk in deze periode werd geleverd door de Leuvensche school. Terecht kantten M. IDE en zijn medewerkers zich tegen hen, die theoretische bezwaren opperden zonder experimenteelen grond. Hoewel hun werk niet vrij is van een zekere vooringenomen-

heid met de bios-hypothese, moet men toegeven, dat hun experimenteele bewijsvoeringen heel wat beter zijn dan bovengenoemde theoretische critiek.

A. AMAND (1, 2) ontzenuwde door overtuigende experimenten het grootste deel van de bezwaren van FERNBACH en WINDISCH. Bovendien constateerde hij, dat wanneer men gist kweekt in een oplossing, waarin zich voldoende bios bevindt, deze stof na eenigen tijd uit die cultuur verdwenen is. Uit de gistcellen was zij door gewone extractie niet terug te winnen.

AMAND vond verder, dat het bios-gehalte der cellen al naar gelang van de samenstelling van den voedingsbodem sterk varieert.

Een zeer belangrijke publicatie der Leuvensche school verscheen van de hand van R. DEVLOO (7). Deze kon de resultaten van WILDIERS geheel bevestigen en zette diens pogingen tot isolatie van bios voort. Hij vond, dat de actieve stof voorkomt in zuivere lecithine-preparaten. Het was een stikstofhoudende base, die geen verband hield met choline en hiervan was te scheiden door precipitatie met mercurichloride en bariumhydroxyde. Choline en derivaten bleken evenals een aantal alkaloiden onwerkzaam te zijn; opium en belladonna-extract bevatten rijkelijk bios.

De aanvallen van PRINGSHEIM e.a. werden afgeslagen door IDE (30). Deze merkte op, dat PRINGSHEIM met op ammoniumzouten ingestelde gist nooit die intensieve gisting verkreeg, welke optreedt wanneer men niet geacclimatiseerde cellen laat groeien op een bios-rijken voedingsbodem. Niet alleen, dat hij van een acclimatiseeren van de door hem gebruikte gist niets kon ontdekken, IDE vond zelfs, dat cellen, die lang op een bios-arme

voedingsoplossing hadden geleefd, dusdanig pathologisch waren verzwakt, dat zij bij toevoeging van bios niet meer tot normale gisting waren te brengen. IDE laat geheel in het midden of bios onontbeerlijk, of alleen „höchst vorteilhaft" is, of het dient tot opbouw van eiwitten en of het op alle gistsoorten denzelfden invloed uitoefent. Het was hem alleen te doen om die stof te isoleeren, welke noodzakelijk blijkt te zijn voor het teweeg brengen van een *normaal* gistingsbeeld.

Een interessant onderzoek van A. Kossowicz (34, 35) mag niet ongenoemd blijven. Hij ontdekte, dat wanneer men bacteriën en schimmels entte op een gistcultuur met anorganische zouten en suiker als voedingsbron, deze cultuur zich normaal ontwikkelde. Ook dood mycelium was in staat den groei te versnellen. Evenals WILDIERS erkende hij, dat sporen van bepaalde organische stoffen een grooten invloed hebben op de voortplantingssnelheid van gist.

B. Van de ontdekking der vitaminen tot heden.

Het vitamine-vraagstuk ontwikkelde zich bijna gelijktijdig met het bios-probleem. In 1896 verscheen C. EYKMAN's eerste publicatie (18a) van zijn klassieke onderzoekingen over beri-beri. Evenmin als WILDIERS ontkwam hij aan den invloed van de aanhangers van PASTEUR. Het onderzoek van polyneuritis werd met kracht voortgezet, dank zij het groote belang, dat men er in Nederlandschen Engelsch-Indië bij had de oorzaak en, indien mogelijk, een therapie van beri-beri te vinden. De resultaten van het onderzoek van EYKMAN waren oorzaak, dat het begrip „vitamine" spoedig algemeen werd geaccepteerd. Hierdoor leek het niet meer zoo verwonderlijk, dat ook gist

voor een normale ontwikkeling een dergelijk vitamine noodig zou hebben en men erkende de mogelijkheid, dat bios deze rol zou vervullen.

Het nieuwe inzicht in de functie van bios leidde tot de foutieve veronderstelling, dat deze stof identiek zou zijn met het vitamine van EYKMAN. De ontwikkeling, die het vraagstuk hierna doormaakte, was aanvankelijk gering. Pas in 1923 werd definitief vastgesteld, dat bios niet gelijk is te stellen met vitamine B. In dezelfde periode werd ook bewezen, dat bios niet identiek kan zijn met het co-enzyme van HARDEN en YOUNG. Tegelijkertijd ontstond opnieuw een strijd over het bestaan en de onmisbaarheid van bios, die van veel belang was voor de physiologie van het vraagstuk. In dezelfde jaren kwam men tot een juister inzicht omtrent de voorzorgen, die bij het bios-onderzoek dienen te worden betracht. Ook de techniek van dit onderzoek werd aanzienlijk verbeterd.

Hier volgt een kort overzicht van de belangrijkste publicaties uit dit tijdperk.

U. SUZUKI (57a) bereidde uit rijst het oryzanine, dat sterk anti-neuritisch werkzaam was. K. KUNONO (36) bewees, dat dezelfde stof in kleine concentraties den groei van gist bevorderde. R. J. WILLIAMS (62) nam aan, dat gist, evenals dieren, een vitamine noodig zou hebben om zich krachtig te kunnen ontwikkelen. Op grond van het feit, dat de stof, die den groei van gist bevorderde dezelfde eigenschappen vertoonde als het anti-beri-beri-vitamine en steeds tegelijk hiermede in verschillende extracten aanwezig was, concludeerde hij, dat de beide stoffen identiek moesten zijn. Daaruit zou volgen, dat men in plaats van kostbare proefdieren ook gist als ijkmateriaal kon gebruiken voor de waardebeoordeling van vitamine-B extracten. Als maatstaf voor het vitamine-gehalte koos WILLIAMS de gevormde hoeveelheid gist (63). F. BACHMANN (3) kwam tot dezelfde conclusies. Zij bepaalde echter

de groeitoename door meten van het ontwikkelde koolzuur. W. H. EDDY en H. C. STEVENSON (10, 11, 12) volgden ongeveer de methode van WILLIAMS, centrifugeerden de gist in een soort TROMMSDORFF-buisje en kwamen evenals F. SWOBODA (59) en C. FUNK en H. E. DUBIN (25, 27) tot de overtuiging, dat de gist-"test" specifiek was voor vitamine B. C. FUNK en J. B. PATON (29) constateerden, dat sommige anti-neuritisch werkzame extracten geen invloed uitoefenden op gist. In plaats van aan de identiteit van bios en vitamine B te twijfelen, namen zij aan, dat deze extracten een voor gist giftige stof zouden bevatten.

Een jaar na de publicaties van WILLIAMS kwam critiek van de zijde van A. D. EMMET en M. STOCKHOLM (14), die vonden, dat bepaalde preparaten met sterke bios-werking niet in staat waren de ontwikkeling van op vitamine B-vrij diët gekweekte jonge ratten te bevorderen. Zij trokken de waarde van de gist-"test" voor de quantitative bepaling van het anti-neuritische vitamine in twijfel en maakten de gevolgtrekking, dat deze stof niet identiek kon zijn met de substantie, die den groei van gist beïnvloedde. Tot gelijklopende resultaten kwamen: G. DE P. SOUZA en E. V. MCCOLLUM (55), W. D. FLEMING (20), E. I. FULMER, V. E. NELSON en F. F. SHERWOOD (23) en M. B. McDONALD en E. V. MCCOLLUM (42, 43). Ook FUNK en DUBIN (26) veranderden van meening, toen zij de belangrijke ontdekking deden, dat gist-extract was te scheiden in twee fracties, waarvan één anti-neuritisch werkzaam was, terwijl de andere de gist-ontwikkeling versnelde. Hun voorstel om het „gist-vitamine" voortaan vitamine D te noemen vond geen bijval.

De functie van bios werd nog verder gepreciseerd door H. VON EULER en medewerkers (16, 17), die door vergelijkende quantitative metingen der celtoename en der koolzuur-productie ¹⁾ aantoonde, dat bios de levensuitingen van de gist-cel anders beïnvloedt dan het co-enzyme van HARDEN en

¹⁾ VON EULER kwam tot de conclusie, dat de gisting en de cel-deeling door verschillende „bio-katalysatoren" (resp. „Faktor Z" (18) en „bios") zouden worden beïnvloed. Deze opvatting werd gesteund door een onderzoek van T. PHILIPSON (52) doch weer

YOUNG. T. THOLIN (60) bewees bovendien, dat deze laatste stof zich van den groefactor tevens onderscheidt door een groo-tere gevoeligheid voor zuur en een geringere bestendigheid tegen verhitting.

Niettegenstaande in deze jaren talrijke onderzoeken overtuigend hadden bewezen welk een belangrijke rol bios speelt bij de voortplanting van de gist, vindt men in denzelfden tijd tóch nog publicaties, die het belang er van negeerden. Zelfs werd door enkelen [b.v. P. LINDNER (39, 40) en H. NAUMANN (49)] het bestaan van bios tegengesproken! De hierop betrekking hebbende onderzoeken zijn vol tegenstrijdigheden. Door gebrek aan uitvoerige gegevens omtrent de zuiverheid der gebruikte chemicaliën en omtrent de vergelijkbaarheid der gistsoorten, is de waarde van deze proefnemingen gering. Een viertal publicaties is karakteristiek voor de verwardheid van de situatie.

MCDONALD en MCCOLLUM (42, 43) kwamen tot de conclusie, dat gist kon groeien op een door hen uit rietsuiker en eenige anorganische zouten samengestelde voedingsoplossing. Naar aanleiding hiervan verscheen een artikel van M. IDE (31) — leider van de reeds genoemde Leuvense school —, die er nog eens op wees, dat men twee soorten gist-ontwikkeling scherp dient te onderscheiden, n.l. een abnormaal langzame, die op den duur aanleiding kan geven tot degeneratie; en een snelle, die te danken is aan de aanwezigheid van bios. Volgens IDE behoorde het door MCDONALD en MCCOLLUM bestudeerde gistproces ongetwijfeld tot de eerste soort. C. FUNK en L. FREDMAN (28) constateerden, dat rietsuiker een stof bevatte, die den groei van gist versnelde en die was te verwijderen, door de suiker uit 80 % alcohol om te kristalliseeren. Hierdoor was de waarde van onderzoeken, die de mogelijkheid van een normale gist-ontwikkeling op een „synthetische” voedingsbodem moesten bewijzen, twijfelachtig geworden²⁾. Vrij van dezen twijfel is alleen de onderzoeking

tegensproken door H. v. EULER en H. LARSSON (15), die tot de identiteit van bios II en Faktor Z besluiten.

²⁾ Het lijkt mij niet uitgesloten, dat dit de oplossing zou zijn van het twistpunt tusschen PASTEUR en LIEBIG.

van E. I. FULMER, V. E. NELSON en A. WHITE (24), die aantoonen, dat de volgens LOEW uit formaldehyde bereide „methose”, gecombineerd met eenige anorganische zouten een voortreffelijken voedingsbodem voor de door hen gebruikte gist vormde.

Een gedeeltelijke oplossing der problemen, die in deze periode waren ontstaan, vindt men in het werk van A. M. COPPING (6) en in eenige onderzoekingen van WILLIAMS (64, 71, 72, 73), die duidelijk aantoonen hoe verschillend zich de diverse rassen van *Saccharomyces cerevisiae* gedragen en hoe voorzichtig men dientengevolge moet zijn bij het vergelijken der resultaten van verschillende onderzoekers.

A. M. COPPING onderzocht het effect van „Marmite” (= gist-extract) op een twintigtal gistsoorten, die variëerden van wilde tot sterk veredelde rassen. Bovendien gebruikte zij vijf verschillende voedingsbodems. Het bleek, dat de veredelde rassen hierop slechts zeer gebrekkig groeiden, maar dat zij na toevoeging van „Marmite” een belangrijke opleving vertoonden. De wilde soorten waren daarentegen ongevoelig voor dit gist-extract en ontwikkelden zich zonder enig toevoegsel volkomen normaal. Ook merkte zij op, dat de behoefte aan bios waarschijnlijk zou samenhangen met de gistings-intensiteit. Toevoegen van gist-extract veroorzaakte n.l. een verhoogde koolzuur-productie en een krachtiger ademhaling; zij kon echter niet uitmaken of dit laatste te danken was aan het grootere aantal cellen of aan een werkelijke verandering in de stofwisseling.

WILLIAMS toonde aan hoe de cultuurgisten ook ten opzichte van de bios-factoren een zeer uiteenlopende kieskeurigheid vertoonen.

Kenmerkend voor het verschillend gedrag der gistrassen is ook de volgende mededeeling van MILLER: „Lucas compared Toronto-yeast with two races brought by professor Eddy to the B.A. meeting 1924; both gave larger crops with bios, but one a larger crop without the bios, than the other with it”. Het spreekt vanzelf, dat ook hierin een verklaring zou kunnen liggen van de oneenigheid tusschen PASTEUR en LIEBIG.

Na het werk van DEVLOO, was het bios-onderzoek min of meer op een dwaalspoor geraakt. Weliswaar had men eenige vorderingen gemaakt op physiologisch gebied en had men kunnen vast stellen wat bios *niet* was.

Men zou echter niet veel verder zijn gekomen, indien men zich na 1923 niet weer geconcentreerd had op de isolatie van chemisch gedefinieerde stoffen.

De mededeeling van W. H. EDDY (9) over het „thio-amino-zuur” van J. H. MUELLER (47) en het werk van V. LEPESCHKIN (37) met het „gekristalliseerde vitamine” van FUNK zijn van weinig waarde, daar beide preparaten zonder eenigen twijfel onzuiver waren. Ook het belang van een reeks Japansche onderzoekingen is eenigszins twijfelachtig. Het zou evenwel de moeite waard zijn de door Y. KINUGASA (33) uit rijstzemenen geïsoleerde stof met de formule $C_{10}H_8N_4$ te „testen” op de door WILLIAMS of MILLER gebruikte gistsoorten en haar activiteit te vergelijken met andere preparaten. Minder belangrijk lijken mij in dit verband de door B. SUZUKI en medewerkers (56, 57) geïsoleerde producten.

Het bios-vraagstuk werd nog een graad ingewikkelder toen langzamerhand bleek, dat bios geen enkelvoudige stof was.

De eerste mededeeling in die richting kwam van E. I. FULMER, W. W. DUECKER en V. E. NELSON (22). Zij extraheerden

gedroogd Alfalfa-gras eerst met absoluten alcohol (extr. I), vervolgens met water (extr. II). Beide extracten vertoonden bij een bepaalde concentratie een maximaal groei-effect. Door de oplossingen te combineeren werd echter een veel grootere uitwerking waargenomen.

W. H. EDDY, R. W. KERR en R. R. WILLIAMS (9) behandelde een extract uit ge-autolyseerde gist bij verschillende PH met een ferri-hydroxyde-sol. Uit één der aldus verkregen neerslagen kon een actieve kristallijne stof worden geïsoleerd, die bij 223° smolt en die de formule $C_5H_{11}NO_3$ bleek te hebben. Met deze stof alleen kon de werkzaamheid van het oorspronkelijke gist-autolysaat niet worden verklaard. Het gelukte KERR (32) uit hetzelfde extract door electro-dialyse een α -, β - en γ -bios af te scheiden; volgens hem was geen der drie fracties chemisch zuiver.

De meest waardevolle gegevens over de bios-factoren danken wij in hoofdzaak aan W. L. MILLER uit Toronto en aan R. J. WILLIAMS uit Oregon. Aangezien hun resultaten moeilijk vergelijkbaar zijn, zal ik deze afzonderlijk bespreken.

De eerste twee publicaties uit MILLER's school, van C. G. FRASER en van N. A. CLARK, zijn van fundamenteel belang voor de quantitative bepalingmethode van bios. FRASER (21) verbeterde de kweekmethode door de gist te laten groeien in L-vormige buizen, die in een thermostaat voortdurend werden geschud. Hierdoor bleven de gistcellen steeds in suspensie en men was zeker van voldoende luchttoevoer. Van deze technische verbeteringen maakte CLARK (5) gebruik, toen hij de voortplantings-snelheid van gist in wort bestudeerde. Hij gebruikte een gistsoort, die in een „synthetische” voedingsoplossing zonder bios zeer langzaam groeide, maar die zich na toevoegen van de bios-rijke wort zeer snel deelde. De voort-

plantingssnelheid bleek onafhankelijk te zijn van de hoeveelheid toegevoegde wort; zij was echter op ieder willekeurig oogenblik evenredig met het op dat moment aanwezige aantal cellen. De celvermeerdering bleek, mits een teveel aan gevormden alcohol niet de rol van beperkende factor speelde, een zuiver logaritmische functie te zijn. De voortplanting hield practisch gesproken op, wanneer het aanwezige bios was verbruikt. De gistopbrengst werd bepaald met behulp van een haemacytometer; hij was ten naastebij evenredig met de hoeveelheid toegevoegd bios en onafhankelijk van het aantal cellen waarmee werd geënt. Zette men de procentueele toename logaritmisch uit tegen den tijd, dan was de hoek, die de verkregen lijn maakte met de tijd-as karakteristiek voor een bepaald preparaat (45). Op deze gegevens is de meetmethode van MILLER en medewerkers gebaseerd.

G. H. W. LUCAS (41) ontdekte, dat bios-preparaten uit zeer uiteenlopende dierlijke en plantaardige producten door behandeling met bariet in alcoholische oplossing waren te scheiden in twee factoren. De factor in het neerslag, die tevens wordt geprecipiteerd door basisch lood-acetaat, werd bios I, die in het filtraat bios II gedoopt.

E. V. EASTCOTT (8) bereidde bios I uit thee en identificeerde deze factor als meso-inosiet.

In 1924 vermeldde MILLER (44) terloops, dat FRASER erin was geslaagd bios II verder te fractioneeren. Pas in 1933 (46) publiceerde hij hierover een uitgebreid verslag, waarin werd beschreven hoe van bios II uit gist bij behandeling met kool een gedeelte werd geadsorbeerd (bios II-B) en een ander deel (bios II-A) in oplossing

bleef. Bios II-B was met behulp van verdunde aceton en ammonia van de kool te elueeren. De combinatie der drie aldus gescheiden factoren had ongeveer dezelfde activiteit als het oorspronkelijke gist-extract. Toegevoegd aan een gist-suspensie veroorzaakte factor II-B alleen reeds een geringe groeitoename, terwijl de beide andere factoren, afzonderlijk toegevoegd, geen activiteit vertoonden. MILLER werkte met een reincultuur van Fleischmann-gist. De drie factoren werden echter ook op andere gistrassen „getest”. Hierbij bleken de door WILDIERS gebruikte gist en vier specimina van de American Type Culture Collection op dezelfde wijze te reageeren.

De resultaten van T. PHILIPSON (53) zijn geheel in overeenstemming met die van MILLER, wat betreft de splitsing in bios I en II. Koolbehandeling leidde bij PHILIPSON evenwel niet tot de ontdekking van een derden factor.

B. T. NARAYANAN (48) en WILLIAMS (72) meenden te moeten ontkennen, dat inosiet een rol zou spelen als bios-factor. Aangezien echter geen van beiden de scheiding met bariet en alcohol of met basisch lood-acetaat heeft toegepast, is het zeer waarschijnlijk, dat hun actieve extracten genoeg inosiet bevatten om het uitblijven van een effect bij toevoegen van inosiet te verklaren.

WILLIAMS (70) kwam tot een scheiding der bios-factoren met behulp van voller's aarde. De verkregen fracties werden afzonderlijk en gecombineerd „getest” op een reeks gist-soorten, die zeer verschillend reageerden (72). Twee soorten waren voor den geadsorbeerden factor ongevoelig; zij vertoonen in dit opzicht overeenkomst met de door MILLER gebruikte gisten. WILLIAMS en E. M. BRADWAY (64) slaagden er in de door voller's aarde geadsorbeerde fractie van een rijstzemelen-extract in drie

verschillende factoren te splitsen, waarvan er één identiek was met het vitamine van B. C. P. JANSEN en W. F. DONATH (31a). Terecht concludeert WILLIAMS m.i., dat deze factoren niets gemeen hebben met die van MILLER, aangezien deze laatste niet worden geadsorbeerd door voller's aarde.

Tegen het einde van 1931 publiceerde WILLIAMS (65) hoe hij met behulp van electro-dialyse tot een bioscheiding was gekomen. De verkregen fracties zouden allen t.o.v. de gist van WILDIERS een aanvullende werking vertoonen. Daarentegen werd „Gebrüde Mayer”-gist alleen door den zuren factor zeer sterk beïnvloed. WILLIAMS (66) paste zijn scheidingsmethode toe op de meest uiteenlopende plantaardige en dierlijke extracten, vond, dat allen dezen factor bevatten en doopte hem „Pantothenic-acid”. In welk verband de „electrolysefactoren” staan tot de met voller's aarde verkregen factoren is voorloopig niet duidelijk.

Uit acetylerings- en veresteringsproeven met totaal onzuivere preparaten concludeerde WILLIAMS (66), dat pantotheenzuur een verzadigd alifatisch poly-oxy-zuur zou zijn. Wanneer men bedenkt, dat het uitgangsmateriaal voor deze proeven misschien niet meer dan 1 ⁰/₁₀₀ actieve substantie bevatte, lijken mij deze gevolgtrekkingen eenigszins voorbarig. Hetzelfde geldt m.i. voor WILLIAMS' bepaling van de dissociatie-constante van pantotheenzuur (68). Het meest belangrijk is waarschijnlijk de vermelding van het moleculair gewicht, dat met behulp van de diffusie-methode werd bepaald op 150 à 200. In een, onlangs verschenen, voorloopige publicatie vergelijkt WILLIAMS (71) het effect van pantotheenzuur, inosiet en vitamine B₁, in verschillende combinaties „ge-

test", op diverse gist-soorten en komt tot resultaten, die gedeeltelijk in tegenspraak zijn met zijn vroegere mededeelingen.

De laatste mededeeling over het bios-vraagstuk, de publicatie van F. KÖGL over het isoleeren van biotine uit eigeel, zal in hoofdstuk III nog nader worden vermeld.

Hiermede is in korte trekken de geschiedenis van het bios-onderzoek geschetst.¹⁾ Van critiek heb ik mij bijna geheel onthouden, daar dit de overzichtelijkheid zou hebben geschaad.

Samenvattend valt het volgende op te merken. De grootste moeilijkheid bij het bestudeeren der bios-literatuur ligt in het feit, dat de resultaten van verschillende auteurs buitengewoon slecht zijn te vergelijken. Bij dit vergelijken zijn de volgende punten van groot belang:

- 1) het gist-ras,
- 2) de samenstelling van de voedingsoplossing,
- 3) de kweektijd,
- 4) de kweektemperatuur,
- 5) de meet-methode,
- 6) de zuiverheid der gebruikte chemicaliën,
- 7) de mate van steriliteit bij het onderzoek betracht.

De bios-factoren, in water opgelost, zijn niet te extraheeren met de gebruikelijke oplosmiddelen. Men is daardoor, bij poging tot hun isolatie, genoodzaakt gebruik te maken van methodes, gebaseerd op neerslaan en adsorptie. Men vindt in de literatuur dan ook vele opgaven over oplosbaarheid en mogelijkheden van precipitatie etc., die echter meestal betrekking hebben op ruwe

¹⁾ Niet behandeld zijn de publicaties over stoffen, die den groei bevorderen van bacteriën en schimmels, hoewel het niet onmogelijk is, dat deze ten nauwste met bios verwant zijn.

extracten of op zeer onzuivere preparaten. Nu kan de mate, waarin verontreinigingen in extracten voorkomen, beslissend zijn voor het al of niet neerslaan of geabsorbeerd worden van een actieve stof. Ook op de oplosbaarheid in organische oplosmiddelen hebben deze verontreinigingen dikwijls een zeer grooten invloed. Belangrijk zijn natuurlijk ook de verdunning, de P_H , de temperatuur en tal van andere omstandigheden, waarbij men precipiteert of waarbij men adsorbeert. Het onvolledig vermelden van deze gegevens is dan ook de reden van het waardeloos zijn van vele opgaven omtrent de eigenschappen van bios.

LITERATUUR-REGISTER.

1. AMAND, A. *La Cellule* **20**, 225 (1902).
2. AMAND, A. *La Cellule* **21**, 329 (1904).
3. BACHMANN, F. *J. Biol. Chem.* **39**, 235 (1919).
BORCHARDT, H. en PRINGSHEIM, H. *Bull. Soc. Chim. biol.* **16**, 736 (1934). Zie ook *Chem. Abstr.* **28**, 5838 (1934).
BUSTON, H. W. en KASINATHAN, S. *Biochem. J.* **27**, 1859 (1933).
BUSTON, H. W. en PRAMANIK, B. N. *Biochem. J.* **25**, 1671 (1931).
BUSTON, H. W. en PRAMANIK, B. S. *Biochem. J.* **25**, 1656 (1931).
4. CHRZASZCZ, T. *Cent. Bakt. II Orig.* **13**, 144 (1904).
5. CLARK, N. A. *J. Phys. Chem.* **26**, 42 (1922).
6. COPPING, A. M. *Biochem. J.* **23-II**, 1050 (1929).
7. DEVLOO, R. *La Cellule.* **23**, 361 (1906).
8. EASTCOTT, E. V. *J. Phys. Chem.* **32**, 1094 (1928).
9. EDDY, W. H., KERR, R. W. en WILLIAMS, R. R. *Am. Soc.* **46**, 2846 (1924). Zie ook *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **21**, 307 (1924).
10. EDDY, W. H. en STEVENSON, H. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **17**, 52 (1919).
11. EDDY, W. H. en STEVENSON, H. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **17**, 122 (1920).
12. EDDY, W. H. en STEVENSON, H. C. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **17**, 218 (1920).
ELVEIJEM, C. A. *J. Biol. Chem.* **90**, 111 (1931).
13. EMMETT, A. D. en LUCOS, G. O. *J. Biol. Chem.* **43**, 265 (1920).
14. EMMETT, A. D. en STOCKHOLM, M. *J. Biol. Chem.* **43**, 287 (1920).
15. EULER, H. VON, en LARSSON, H. *H.S.* **223**, 189 (1934).
16. EULER, H. VON, en MYRBÄCK, K. *H.S.* **115**, 155 (1921).
17. EULER, H. VON, en PETERSON, A. *H.S.* **114**, 4 (1921).
EULER, H. VON, en PHILIPSON, T. *Biochem. Z.* **245**, 418 (1932).
18. EULER, H. VON, en SWARTZ, O. *H.S.* **140**, 163 (1924).
- 18a. EYKMAN, C. *Geneesk. Tijdschr. Ned. Indië* **36**, 214 (1896).
19. FERNBACH, A. *Ann. de la Brasserie et de la Distillerie* blz. 510 (1901). Zie ook *Wochenschr. f. Brauerei* **19**, 2 (1902).
20. FLEMING, W. D. *J. Biol. Chem.* **49**, 119 (1921).
21. FRASER, C. G. *J. Phys. Chem.* **25**, 1 (1921).

22. FULMER, E. I., DUECKER, W. W. en NELSON, V. E. *Am. Soc.* **46**, 723 (1924).
23. FULMER, E. I., NELSON, V. E. en SHERWOOD, F. F. *Am. Soc.* **43**, 186 en 191 (1921). Zie ook *J. Biol. Chem.* **46**, 77 (1921).
24. FULMER, E. I., NELSON, V. E. en WHITE, A. *J. Biol. Chem.* **57**, 397 (1923).
25. FUNK, C. en DUBIN, H. E. *J. Biol. Chem.* **44**, 487 (1920).
26. FUNK, C. en DUBIN, H. E. *J. Biol. Chem.* **48**, 437 (1921).
27. FUNK, C. en DUBIN, H. E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **17**, 175 (1920).
28. FUNK, C. en FREEDMAN, L. *J. Biol. Chem.* **56**, 851 (1923).
29. FUNK, C. en PATON, J. B. *J. Metabol. Res.* **1**, 737 (1922).
GUIA, B. C. *Nature* blz. 131 (1931).
HARTELIUS, V. *Biochem. Z.* **261**, 76 (1933). Zie ook blz. 89.
30. IDE, M. *Cent. Bakt. II*, **18**, 193 (1907).
31. IDE, M. *J. Biol. Chem.* **46**, 521 (1921).
- 31a. JANSSEN, B. C. P. en DONATH, W. F. *Proc. Acad. Sci. Amsterdam* **29**, 1390 (1926).
32. KERR, R. W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **25**, 344 (1928).
33. KINUGASA, Y. *J. Pharm. Soc. Japan.* **48**, 539 (1928). Zie ook *Chem. Abstr.* blz. 3915 (1928).
34. KOSSOWICZ, A. *Z. Landw. Versuchsw. Oesterr.* **6**, 27 (1903).
35. KOSSOWICZ, A. *Z. Landw. Versuchsw. Oesterr.* **17**, 688 (1906).
KRUSE, H. D. en MCCOLLUM, E. V. *Physiol. Rev.* **9**, 126 (1929).
36. KURONO, K. *J. Coll. Imp. Univ. Japan.* **5**, 305 (1915).
37. LEPESCHKIN, V. *Am. J. of Bot.* **11**, 164 (1924).
38. LIEBIG, J. VON. *Ann. Chim. Phys.* 4de serie **23**, 5 (1871).
39. LINDNER, P. *Z. Techn. Biol.* **7**, 79 (1919).
40. LINDNER, P. *Z. Techn. Biol.* **9**, 100 (1921).
41. LUCAS, G. H. W. *J. Phys. Chem.* **28**, 1180 (1924).
42. McDONALD, M. B. en MCCOLLUM, E. V. *J. Biol. Chem.* **45**, 307 (1921).
43. McDONALD, M. B. en MCCOLLUM, E. V. *J. Biol. Chem.* **46**, 525 (1921).
44. MILLER, W. LASH. *Science.* **59**, 197 (1924).
45. MILLER, W. LASH. *J. Chem. Education.* **7**, 257 (1930).
46. MILLER, W. LASH, EASTCOTT, E. V. en MACONACHIE, J. E. *Am. Soc.* **55**, 1502 (1933).

- MILLER, W. LASH, EASTCOTT, E. V. en SPARLING, E. M. Chem. Abstr. **27**, 1649 (1933). Zie ook Proc. Trans. Roy. Soc. Canada III, **26**, 165 (1932).
47. MUELLER, J. H. J. Biol. Chem. **56**, 157 (1923).
48. NARAYANAN, B. T. Biochem. J. **24**, 6 (1930).
49. NAUMANN, H. Zschr. Techn. Biol. **7**, 1 (1919).
 NIELSEN, N. Biochem. Z. **237**, 244 (1931).
 NIELSEN, N. en HARTELIUS, V. Biochem. Z. **256**, 2 (1932).
 NIELSEN, N. en HARTELIUS, V. Biochem. Z. **259**, 340 (1933).
50. PASTEUR, L. Ann. Chim. Phys. 3de serie, **58**, 323 (1860).
51. PASTEUR, L. Ann. Chim. Phys. 4de serie, **25**, 145 (1872).
 PESKETT, G. L. Biochem. J. **18**, 866 (1924).
 PESKETT, G. L. Biochem. J. **21**, 460 (1927).
 PESKETT, G. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **25**, 340 (1928).
52. PHILIPSON, T. H.S. **193**, 17 (1930).
53. PHILIPSON, T. Biochem. Z. **258**, 244 (1933).
54. PRINGSHEIM, H. Cent. Bakt. **16**, 111 (1906).
 READER, V. Biochem. J. **21**, 904 (1927).
 READER, V. Biochem. J. **22**, 434 (1928).
 READER, V. Biochem. J. **23**, 61 (1929).
 RICHARDS, O. W. J. Biol. Chem. **96**, 416 (1932).
55. SOUZA, G. DE P. en McCOLLUM, E. V. J. Biol. Chem. **44**, 113 (1920).
 STANTIAL, H. Proc. Trans. Roy. Soc. Canada. III. **26**, 163 (1932). Zie ook Chem. Abstr. **27**, 1915 (1933).
56. SUZUKI, B. Proc. Imp. Acad. Japan. **3**, 521 (1928) en **4**, 158 (1928).
57. SUZUKI, V. en SUZUKI, B. J. Chem. Soc. Japan. **44**, 228 (1923).
 Zie ook Chem. Abstr. **17**, 2907.
- 57a. SUZUKI, U., SHIMAMURA, T. en ODAKE, S. Biochem. Z. **43**, 89 ('12).
58. TANNER, F. W. Chem. Rev. **1**, 397 (1925).
59. SWOBODA, F. J. Biol. Chem. **44**, 531 (1920).
60. THOLIN, T. H.S. **115**, 235 (1921).
61. WILDIERS, E. La Cellule. **18**, 313 (1901).
 WILLAMAN, J. J. en OLSEN, A. G. J. Biol. Chem. **55**, 815 (1923).
62. WILLIAMS, R. J. J. Biol. Chem. **38**, 465 (1919).
63. WILLIAMS, R. J. J. Biol. Chem. **42**, 259 (1920).
64. WILLIAMS, R. J. en BRADWAY, E. M. Am. Soc. **53**, 783 (1931).

65. WILLIAMS, R. J. en TRUESDAIL, J. H. *Am. Soc.* **53**, 4171 (1931).
 66. WILLIAMS, R. J., LYMAN, C. M., GOODYEAR, G. H., TRUESDAIL, J. H. en HOLADAY, D. *Am. Soc.* **54**, 3462 (1932). Zie ook id. **55**, 2912 (1933).
 67. WILLIAMS, R. J., McALISTER, E. D. en ROEHM, R. R. *J. Biol. Chem.* **83**, 315 (1929).
 68. WILLIAMS, R. J. en MOSER, R. *Am. Soc.* **56**, 169 (1934).
 69. WILLIAMS, R. J. en ROCHIN. *J. Biol. Chem.* **87**, 581 (1931).
 70. WILLIAMS, R. J. en ROEHM, R. R. *J. Biol. Chem.* **87**, 581 (1930).
 71. WILLIAMS, R. J. en SAUNDERS, D. H. *Biochem. J.* **28**, 1887 (1934).
 72. WILLIAMS, R. J., WARNER, M. E. en ROEHM, R. R. *Am. Soc.* **51**, 2764 (1929).
 73. WILLIAMS, R. J., WILSON, J. L. en VON DER AHE, F. H. *Am. Soc.* **49**, 227 (1927).
 74. WINDISCH, W. *Wochenschr. f. Brauerei.* **19**, 2 (1902).
 75. WINDISCH, W. *Wochenschr. f. Brauerei.* **19**, 27 (1902).
 76. WINDISCH, W. *Wochenschr. f. Brauerei.* **19**, 527 (1902).
ZELLER, H. *Biochem. Z.* **266**, 367 (1933); en andere publicaties.
-

HOOFDSTUK II.

De meetmethode.

A. Inleiding.

In de literatuur vindt men een aantal methodes beschreven, die ten doel hebben den invloed te bestudeeren, welke bios uitoefent op gistcellen. Vergelijkt men deze methodes, dan valt in de eerste plaats op, dat verschillende onderzoekers geheel verschillende effecten hebben gemeten.

WILDIERS, AMAND en DEVLOO bepaalden het door koolzuurontwikkeling veroorzaakte gewichtsverlies van hun culturen. Kossowicz bepaalde daarnaast ook nog de toename van de hoeveelheid gevormde alcohol.

Hiertegenover staan een reeks onderzoekers, die de gistproductie hebben gemeten. Deze werd op zeer verschillende wijzen bepaald. FUNK en DUBIN waren de eersten, die de gist afcentrifugeerden en door meten van de hoogte van de gistkolom in de centrifugebuis, de volumentoename bepaalden. WILLIAMS filtreerde de gevormde gist af en beoordeelde het bios-effect naar de gewichtstoename, een methode, die ook door anderen werd toegepast. Bij latere onderzoekingen gebruikte WILLIAMS een nephelometer; de hiermede gevonden extinctie is een maat voor de volumentoename. MILLER en zijn leerlingen telden het aantal cellen met behulp van een haemacytometer, het-

geen theoretisch de beste methode is ter bepaling van de voortplantingssnelheid. Hoewel echter bij gist de groei, de gisting en de voortplantingssnelheid ten nauwste met elkaar verband houden, is het onjuist deze levensuitingen, wat hun intensiteit betreft, evenredig te stellen. Het is b.v. bekend, dat cellen nog kunnen fermenteerden nadat de groei reeds heeft opgehouden¹⁾; het valt dus niet aan te bevelen den groei te beoordeelen naar de koolzuur-productie. Daar SLATOR vond, dat na stilstand der celdeling het volume van de gist nog 20 % kon toenemen, blijkt, dat men uit volumen-veranderingen niet zonder meer conclusies mag trekken over de voortplantingssnelheid. Uit dit alles is duidelijk hoe slecht de resultaten van verschillende onderzoekers zijn te vergelijken.

In verband met de talloze variaties, die in de meetmethodiek zijn aan te brengen, valt nog het volgende op te merken. Voor den bioloog zijn alle zijpaden van dit probleem van belang, omdat zij hem een vollediger beeld van de physiologie der gist geven. De chemicus zal zich echter moeten beperken. Hem is het er n.l. om te doen, met behulp van een zoo betrouwbaar en zoo snel mogelijke biologische „test”, die stof of dat complex van stoffen te vinden, die oorzaak zijn van het effect, waarop de door hem gekozen „test” berust. Heeft hij deze stof of dit complex van stoffen gevonden, dan dient hij te bedenken, dat deze substantie zonder meer alleen specifiek is voor het effect, dat hij onder bepaalde omstandigheden, aan een bepaalde levensfunctie van een bepaalde gistsoort heeft geme-

¹⁾ EULER en PETERSON, H.S. 114, 4 (1921).

ten, m.a.w., dat hiermede het bios van WILDIERS in den ruimsten zin nog niet in zijn geheel behoeft te zijn opgehelderd.

Hier volgt een beschrijving van de op het Org. Chem. Laboratorium te Utrecht door F. KÖGL en B. TÖNNIS uitgewerkte meetmethode, welke nog niet uitvoerig is gepubliceerd. Het is mij een behoefte ook op deze plaats laatstgenoemde mijn welgemeenden dank te betuigen voor de wijze waarop hij mij de methode leerde toe te passen.

De eerste verbetering gold het verkorten van de kweekperiode der gist, die door TÖNNIS werd teruggebracht tot vijf uren. Behalve dat hierdoor de duur van het onderzoek belangrijk werd verkort, werd tegemoet gekomen aan een bezwaar, dat allen langen kweekperiodes aankleeft. Men loopt daarbij n.l. het gevaar het resultaat vertroebeld te zien door het optreden van een of anderen beperkende factor, in den vorm van remmende stofwisselingsproducten, het uitgeput raken van voedingsbestanddeelen of andere complicaties. Door het verkorten der kweekperiode werd de grootte van het waar te nemen effect natuurlijk sterk gereduceerd; dank zij het gebruik van een gevoeligen nephelometer was het niettemin nog ruimschoots voldoende voor het verrichten van nauwkeurige bepalingen.

Een tweede verbetering betrof het meten van bios in een iets hoogere concentratie dan bij een aantal onderzoekers gebruikelijk was. TÖNNIS vond, dat een effect van omstreeks 100 % veel beter reproduceerbaar was dan een groeitoename veroorzaakt door concentraties, waarbij de invloed van bios juist merkbaar begint te worden. Op blz. 33 wordt hier nog nader op ingegaan.

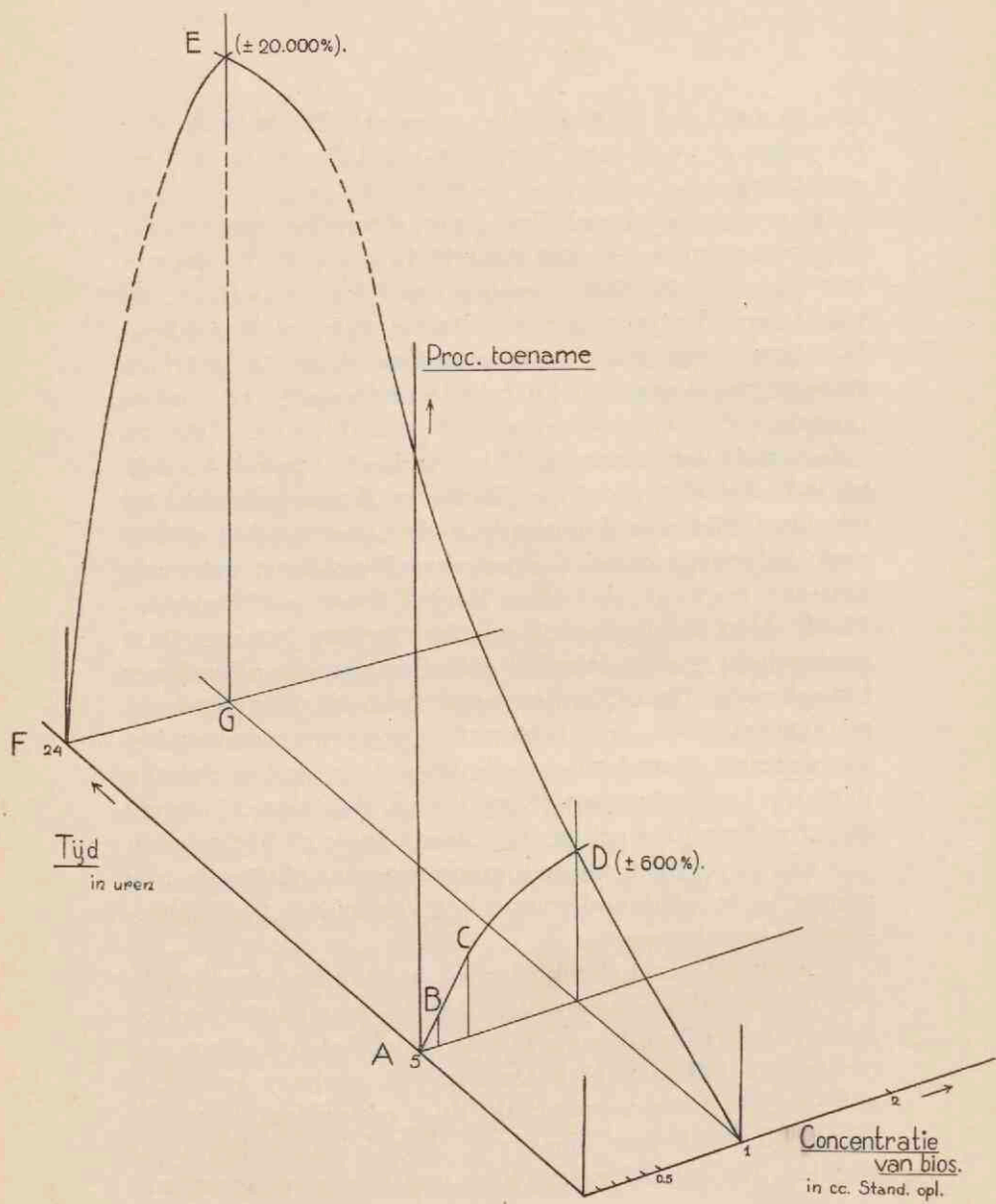


Fig. 1. Verband tusschen toename van den groei, concentratie van bios en kweektijd.

De grootste vooruitgang was de mogelijkheid tot nauwkeurig quantitatief meten. Hierbij leidden hem de volgende overwegingen. Een quantitatieve bepaling is alleen dan mogelijk, wanneer men meet onder omstandigheden, waarbij de toename van het celmateriaal evenredig is aan de hoeveelheid toegevoegd bios, m.a.w. in een gebied waar beperkende factoren nog geen rol spelen en waar men alleen het door bios veroorzaakte effect meet.

Het lag voor de hand, dat alleen de lage bios-concentraties, gemeten in een kort tijdsverloop, aan deze voorwaarden zouden voldoen. Wanneer men grafisch tegen elkaar uitzet de verschillende verdunningen en de daarvoor veroorzaakte effecten, blijkt een kromme te ontstaan, waarvan inderdaad het eerste stuk lineair verloopt. (ABC in fig 1).

De methode van KÖGL en TÖNNIS verschilt principieel van de meest gebruikelijke meetwijze, zoals b.v. door MILLER wordt toegepast. De eersten meten de gisttoename als functie van de bios-concentratie; de laatste meet die toename als functie van den tijd, bij een constante bios-concentratie. In fig. 1 is de situatie grafisch voorgesteld. De punten A en F op de tijd-as liggen resp. bij 5 en bij 24 uur. TÖNNIS meet de curve ABCD, berekent het bios-gehalte uit de punten B en C, terwijl de hoogte van punt D (voor gist-extract gemiddeld 600 %) aangeeft tot welke „topprestatie” de gist, na 5 uur groeien, door een bepaalde oplossing in staat wordt gesteld.

Het vlakke verloop van de curve bij de hogere concentraties is niet te wijten aan een beperkend factor van stof-felijken aard. De groei wordt echter gelimiteerd door den

tijd. Ieder bios-preparaat deelt aan de gist een voor dat preparaat karakteristieke groei-snelheid mede, die sterk vermindert, wanneer het bios, of één der bios-factoren, is verbruikt. Dit laatste is het geval bij de punten B en C. Bij punt D en bij hogere concentraties wordt de bios-voorraad niet uitgeput, daar de groei-snelheid niet toereikend was om in 5 uren zóóveel gist te doen ontstaan als daartoe noodig zou zijn geweest. Voor een dergelijke groei-periode heeft de gist vanaf punt D dus alles wat zij noodig heeft en zal zich vanzelfsprekend onverschillig toonen voor hogere bios-concentraties.

MILLER bepaalt daarentegen de curve DE, waarvan hij de ordinaten logaritmisch uitzet. De hoek, die de verkregen rechte lijn maakt met de tijd-as, is karakteristiek voor den aard van het preparaat. Punt E geeft aan de maximale opbrengst, die met de te onderzoeken oplossing is te verkrijgen (aangenomen, dat de gist zonder bios zeer weinig groeit); GE is dus de maat voor de aanwezige hoeveelheid bios.

Dit principieele verschil in meten maakt het vergelijken van onze resultaten met die van anderen voorloopig niet mogelijk. ¹⁾

Wat de uitvoering betreft komt onze methode in groote lijnen neer op het volgende: Een bepaalde hoeveelheid gist wordt ingewogen en door schudden fijn verdeeld in een voedingsoplossing, die behalve glucose, eenige onmisbare anorganische zouten bevat. Van deze suspensie wordt 1 c.c. gepipetteerd in kolfjes, die de te onderzoeken vloeistof in verschillende verdunningen bevatten. Volgens worden deze kolfjes bij 30° C. in een thermo-

¹⁾ Voor vergelijken van de resultaten van twee laboratoria zouden de preparaten tegelijkertijd volgens de verschillende methodes moeten worden gemeten.

staat gedurende 5 uren geschud, waarna aan ieder kolfje een hoeveelheid 1 %₀₀ chloorkresol-oplossing wordt toegevoegd om de gist te doden. Hierna wordt de inhoud van de kolfjes nephelometrisch onderzocht, waarna het mogelijk is de procentueele toename van het celmateriaal uit te rekenen. Zet men deze waarden graphisch uit tegen de gebruikte concentraties, dan ontstaat in het geval van een normaal gist-extract b.v. een curve zooals OABC in fig. 2a. Uit het rechte stuk OB laat zich dan gemakkelijk de hoeveelheid bios berekenen. Hiervoor werd als eenheid aangenomen, de hoeveelheid bios, die onder de hierna nauwkeurige omschrijven omstandigheden in staat is een toename van celmateriaal te geven van 100 %. Deze wordt aangeduid met *Saccharomyces*-eenheid (S. E.).

Zooals later zal blijken is deze curve niet alleen bruikbaar voor de quantitatieve bepaling van bios, maar eveneens voor het quantitatief onderzoek naar de splitsing in factoren.

In de volgende paragrafen vindt men eenige bijzonderheden over de practische uitvoering van deze meetmethode.

B. De gist.

Als „test”-object gebruikten wij de z.g. „Heferasse M”¹⁾, een „Brennerei Oberhefe” welke door het Institut für Gärungsgewerbe te Berlijn in het groot wordt gekweekt.

¹⁾ Door het Institut für Gärungsgewerbe werd ons medege-deeld, dat „Heferasse M” een uit vier „Unterrassen” samenge-stelde menggist is, die sedert vele jaren ten behoeve van bran-derijen en gistfabrieken wordt gekweekt. In hoeverre de door ons

Uitdrukkelijk zij vermeld, dat deze gist geen reïncultuur is. Haar groote gevoeligheid voor bios maakte haar voor ons doel zeer geschikt. Op de door ons gebruikte voedingsoplossing van V. READER ¹⁾ groeide zij slecht, terwijl toevoeging van een minimale hoeveelheid gist-extract een sterke verhooging van de celproductie ten gevolge had. Dank zij de constante eigenschappen van deze gist-soort waren onze metingen gedurende meer dan drie jaren goed reproduceerbaar.

Hoewel onze gist geen reïncultuur was, werd natuurlijk bij iedere behandeling toch zooveel mogelijk steriel gewerkt. Na aankomst werd de gist in een mortier door voorzichtig wrijven zoo goed mogelijk fijn verdeeld en daarna bij 0° C. bewaard in een flesch, voorzien van een doorboorde kurk met een buisje, afgesloten door een wattenprop.

In alle opzichten trachtten wij onze bepalingen steeds zooveel mogelijk onder dezelfde omstandigheden uit te voeren. Om dan ook het aantal cellen, waarmee wij enten, zoo constant mogelijk te houden, werd voor iedere serie bepalingen de gist ingewogen. Al paar mate deze meer of minder water bevatte, gebruikten wij 10 à 12 milligram. Deze werden gesuspendeerd in 50 cc. voedingsoplossing.

C. De voedingsoplossing.

Wij gebruikten een door READER aangegeven oplossing, bestaande uit:

gebruikte bios-factoren op ieder dezer stammen een invloed uitoefenen of in welke mate de groei van één bepaalde stam wordt begunstigd hebben wij niet nagegaan.

¹⁾ Biochem. J. **21**, 904 (1927).

Aqua dest.	1000	cc.
Glucose	10	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	„
MgSO ₄ .8 H ₂ O	0,7	„
KH ₂ PO ₄	1	„
K ₂ HPO ₄	0,16	„
NaCl	0,5	„
Ca(NO ₃) ₂	0,4	„

Van deze stoffen werd steeds de qualiteit „pro analyse” gebruikt. Van de oplossing werd 50 cc. afgemeten in nauwmondsche stopfleschjes van 100 cc., die, voorzien van een wattenprop, tweemaal gedurende 45 min. werden gesteriliseerd bij 100° C., met tusschenpoos van een dag.

De oplossing van READER is eigenlijk bedoeld als voedingsbodem voor *Streptothrix corallinus*. Zij bleek ons echter ook voor gist zeer goed bruikbaar.

D. De verdunningen en de standaard-oplossing.

Zoals ons proefondervindelijk bleek, diende men voor het verrichten van nauwkeurige metingen binnen een zeker concentratie-traject van bios te blijven. De hoogste concentratie wordt bepaald door het punt, waar de curve gaat afwijken van een rechte ¹⁾ (meestal bij 300%). Dit is zonder meer duidelijk uit de beschouwingen op blz. 29; voor de laagste concentratie gebruikten wij een dusdanige bios-verdunning, dat de procentueele toename

¹⁾ Ook de concentraties daarboven werden gemeten. Uit het verloop van dit deel van de curve kan men n.l. belangrijke conclusies trekken omtrent eventueele aanwezigheid van giftige stoffen, aard der bios-factoren, enz.

ongeveer 100 % bedroeg. Wij vonden, dat bij grotere verdunningen deze toename onderhevig was aan niet controleerbare schommelingen, die de nauwkeurigheid ongunstig beïnvloedden.

In geringere mate vertoonden ook de metingen *binnen* het gunstigste concentratie-traject zekere schommelingen, die, in tegenstelling met de afwijkingen bij te kleine concentraties, wél controleerbaar bleken te zijn. Werden n.l. eenige dagen achtereen dezelfde oplossingen gemeten, dan was het opvallend, dat den eenen dag alle metingen hoog waren, terwijl ze een anderen dag alle iets lager uitvielen. Deze paralleliteit bewijst, dat men met een „*dag-invloed*” te doen heeft. Om deze zooveel mogelijk te elimineeren werd iederen dag een „*standaard-oplossing*” van bios gemeten.

Deze oplossing werd als volgt gemaakt:

Een $\frac{1}{2}$ kg gist werd gedurende twee uren gekookt met de viervoudige hoeveelheid water, na afkoelen werd het celmateriaal afgecentrifugeerd en de vloeistof door een z.g. Ultra-Cella-Filter gefiltreerd. Het volumen van het filtraat werd op 2 l gebracht. Deze oplossing, tienvoudig verdund, bleek, na vele malen gemeten te zijn, een gemiddeld gehalte van 12 S.E. per cc. te bevatten. De geconcentreerde oplossing werd steriel in toegesmolten buisjes in de frigidaire bewaard; zij bleef, voor zoover dit was na te gaan, volkomen onveranderd. Een nieuwe standaard-oplossing werd steeds geijkt op de oude en daarna zoodanig verdund of ingedampt, dat zij dezelfde bios-concentratie als deze bevatte.

De metingen van alle preparaten werden vergeleken met die van de standaard-oplossing. Al naarmate deze laatste metingen positieve of negatieve afwijkingen vertoonden van de gemiddelde waarde van 12 S.E. per cc.,

TABEL 1.

	Uitgangswaarde ¹⁾		Blanco waarde ¹⁾	Verdunningen								
				Standaard				Onbek. opl.				
N° v. h. kolfje	0	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
cc. Standaard opl.				0,1	0,3	0,5	1,0					
cc. Onbekende opl.								0,1	0,3	0,5	1,0	
cc. Water	1,0	1,0	1,0	0,9	0,7	0,5		0,9	0,7	0,5		
cc. Chloorkresol.-opl.	20	20										

werden de andere waarnemingen gecorrigeerd door vermenigvuldigen met een factor resp. kleiner of groter dan 1.

Ook bij onderzoeken naar de *bios-factoren*, werden de metingen steeds vergeleken met die van de standaard-oplossing. Het was in verband met deze proeven wenschelijk twee begrippen in te voeren:

1°: „*Standaard-concentratie*”. Een bios-oplossing bevat de standaard-concentratie, wanneer 0,1 cc. daarvan een groei-toename van 120 % veroorzaakt.

2°: „*Standaard-curve*”, dat is de curve, die ontstaat wanneer men de standaard-oplossing in verschil-

¹⁾ De „*uitgangswaarde*” geeft de extinctie aan, veroorzaakt door 1 cc. water + 1 cc. gist-suspensie, die onmiddellijk met 20 cc. chloorkresol-oplossing werden behandeld.

De „*blanco-waarde*” geeft de extinctie aan, veroorzaakt door 1 cc. water + 1 cc. gist-suspensie, die gedurende 5 uren werden gekweekt, zonder toevoeging van bios en pas daarna met 20 cc. chloorkresol-oplossing werden behandeld.

lende concentraties (hoeveelheden van 0,1 tot 1 cc.) meet en deze concentraties graphisch uitzet tegen de overeenkomstige groei-effecten. Deze curve werd *normaal* genoemd, wanneer 1 cc. van de standaard-oplossing een groei-toename veroorzaakte van $\pm 600\%$. (Zie fig. 2a).

Uit proeven bleek ons, dat wanneer wij het bios-gehalte van twee preparaten nauwkeurig wilden vergelijken, deze *ongeveer tot dezelfde concentratie* moesten worden verdund. Gemakshalve namen we hiervoor de standaard-concentratie, dus ± 12 S.E. per cc. Hoe groot de fouten kunnen zijn, wanneer men zich niet aan deze verdunningsbepaling houdt, blijkt uit het voorbeeld op blz. 39.

De oplossing met onbekend gehalte brachten wij na eenige voorloopige metingen op een gehalte van ten naaste bij 12 S.E. per cc. Daarna kon de eigenlijke nauwkeurige meting plaats vinden. Tot dit doel werden in een serie Jena-Erlenmeyers van 20 cc. met wijden hals de in bovenstaande tabel aangegeven hoeveelheden afgemeten. Ieder kolfje bevatte steeds hetzelfde volumen vloeistof.

Een half uur na het maken van de gist-suspensie werd hiervan aan ieder kolfje 1 cc. toegevoegd, waarna deze werden gesloten met een met collodium behandeld kurkje. De geheele reeks werd dan, behalve de twee „uitgangswaarden”, onmiddellijk in de electrisch op 30° C. gereguleerde thermostaat gebracht en daarin gedurende vijf uren geschud met een snelheid van ongeveer 200 schommelingen per minuut. Hierna werd aan alle kolfjes 20 cc. chloorkresol-oplossing toegevoegd om de gistcellen te doden.

E. De Nephelometer.

De toename van het celmateriaal bepaalden wij door van de verkregen gist-suspensies de extinctie te meten met een Nephelometer van MOLL. Dit door de firma KIP te Delft in den handel gebrachte toestel voldeed, wat de gevoeligheid betreft, volkomen aan de gestelde eischen.

De cuvetten werden voor iedere meting zorgvuldig uitgespoeld met water en aceton, daarna met een zeemen lapje afgedroogd.

Vervolgens werd de inhoud van een meetkolfje voorzichtig geschud, zoodat zich geen luchtbelletjes vormden, die de meting zouden storen; daarna werd de verkregen suspensie in de cuvette gegoten. Het meten geschiedde daarna zooals is beschreven in de publicatie van W. J. H. MOLL¹⁾.

F. De berekening.

De procentueele toename aan celmateriaal laat zich uit de gemeten extinctie gemakkelijk berekenen volgens $\frac{(b-a) \cdot 100}{a}$, waarin a de extinctie voorstelt van kolfje n° 0 (uitgangswaarde) en b die van een der overige kolfjes.

Theoretisch was het natuurlijk juister geweest om voor a niet de uitgangswaarde, maar de blanco-waarde te nemen. De ervaring leerde echter, dat dit laatste getal veel meer aan schommelingen onderhevig was dan het eerstgenoemde.

Hoe uit de procentueele toename van het celmateriaal

¹⁾ Verslag. Akad. Wetenschappen Amsterdam 28, 1001 [1919—1920].

het bios-gehalte is te berekenen, wordt verduidelijkt door het voorbeeld in Tabel 2.

TABEL 2.

	Verduunning	Extinctie	Proc. toename
Uitgangswaarde.	—	2,5	—
Blanco-waarde.	—	3,3	32
Standaard opl.	0,1	5,8	132
	0,3	10,0	300
	0,5	16,2	548
	1,0	18,5	640
Onbekende opl.	0,1	6,2	148
	0,3	11,9	376
	0,5	16,5	560
	1,0	18,0	620

Wij gebruikten voor de berekening van het bios-gehalte de metingen, corresponderend met de verdunningen van 0,1 en 0,3 cc. en namen het gemiddelde van de verkregen uitkomsten.

Aangezien 1 S.E. overeenkomt met 100 % toename, geeft

0,1 cc. standaard-oplossing een gehalte van 1,3 S.E., corresponderende met 13 S.E. per cc.

0,3 cc. standaard-oplossing een gehalte van 3,0 S.E., corresponderende met $\frac{10}{3} \cdot 3,0 = 10$ S.E. per cc.

Het gemiddelde is 11,5 S.E. per cc.

De correctie-factor (zie blz. 35) wordt dus $\frac{11,5}{12} = 1,04$.

Voor de onbekende vloeistof vindt men op dezelfde manier:

0,1 cc. geeft een gehalte van 1,5 S.E., corresponderende met 15 S.E. per cc.

0,3 cc. geeft een gehalte van 3,8 S.E., corresponderende met 12,5 S.E. per cc.

Gemiddeld dus 13,8 S.E. per cc.

De correctie-factor in aanmerking genomen vindt men dan ten slotte

$$1,04 \times 13,8 = 14,4 \text{ S.E. per cc.}$$

De aldus verkregen waarden zijn slechts van belang in betrekking tot elkaar, aangezien zij geheel afhankelijk zijn van alle bijzonderheden van een willekeurig gekozen meetmethode.

Zoals reeds op blz. 36 werd gezegd, mag het biosgehalte van de te meten vloeistof niet te veel verschillen van de standaard-concentratie, m.a.w. van 12 S.E. per cc. Het volgende voorbeeld geeft een indruk van de grootte van de fout, die men kan maken door het meten bij een te hoge concentratie.

Een extract van 1 g peterseliezaad op 5 cc. water gaf in een verdunning van 1 : 20 de volgende waarden:

0,1 cc. 360 % toename.

0,3 cc. 585 % toename.

In een verdunning van 1 : 80 vonden wij:

0,1 cc. 143 % toename.

0,3 cc. 337 % toename.

Uit de eerste meting vindt men, dat peterseliezaad een biosgehalte heeft van 2700 S.E. per g, uit de tweede (juiste meting) volgt 4900 S.E. per g.

G. Ervaringen met de meelmethode.

Volledigheidshalve volgen nog eenige ervaringen, die TÖNNIS en ik opdeden gedurende de eerste drie jaren van ons bios-onderzoek.

Evenals bij de meeste biologische „test”-methodes is men afhankelijk van de variabiliteit in wezen en gedrag van een levend organisme. De factoren, die onze metingen aan schommelingen onderhevig deden zijn, waren, voor zoover was na te gaan, tweeërlei:

- 1° de dag-invloed. De oorzaak hiervan is nog niet bekend; een enkele maal leek het of groote afwijkingen samen vielen met meteorologische veranderingen. Zooals uit het onderzoek van F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT¹⁾ bekend is, schommelt ook de gevoeligheid van haverplantjes voor auxine op verschillende dagen zeer sterk, maar ook hier was het niet mogelijk over de oorzaak van dit verschijnsel definitieve conclusies te trekken.
- 2° de qualiteit van de gist. In den eersten tijd van het onderzoek varieerde de kleur der voor het meten gebruikte gist van bijna wit tot vuil bruin-grijs. De eerste soort was meestal erg droog en zeer gemakkelijk te homogeniseeren. Over het algemeen voldeed deze qualiteit het best. De standaard-oplossing gaf hiermede meestal een „normale” curve (zie fig. 2a), d.w.z. de verdunning 0,1 cc. gaf ± 120 , de verdunning 1,0 cc. 500 à 700 % toename van het celmateriaal. Met de bruin-grijze qualiteit werden dikwijls afwijkende resultaten verkregen (zie fig. 2b).

¹⁾ Zie Ber. 68, Abt. A, 16 (1935), blz. 23.

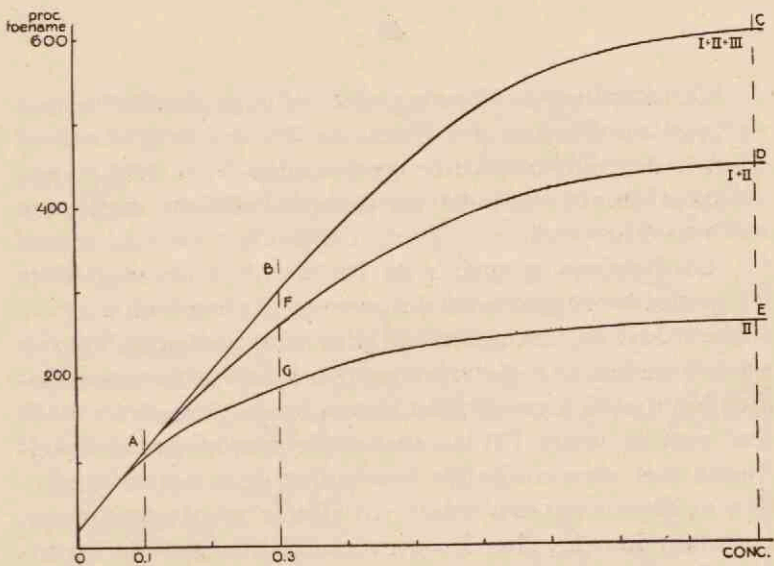


Fig. 2a. „Normale” groei-curven veroorzaakt door bios II, bios I + II en door de standaard-oplossing.

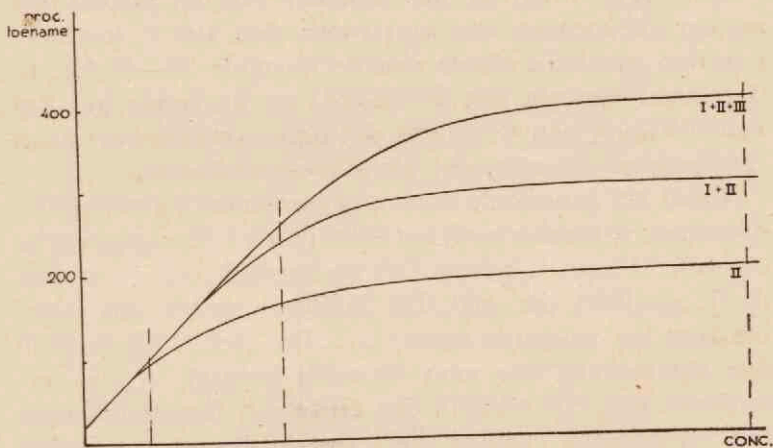


Fig. 2b. „Gedrukte” groei-curven veroorzaakt door dezelfde oplossingen als in fig. 2a.

De standaard-oplossing gaf een „gedrukte” curve met als hoogste groeitoename 350 à 400 %. Zoolang nu de blanco-waarde (gewoonlijk 30 à 40 %) normaal bleef, had dit op de quantitatieve metingen van bios weinig invloed. Het meten van de standaard-oplossing gaf, mits de afwijkingen niet al te groot waren, steeds de gewenschte correctie.

Meer last ondervonden wij van een „gedrukte” curve bij het meten van de effecten der bios-*factoren*, aangezien het meten hiervan juist berust op de „*hoogteverschillen*” van de curve. Uit bovenstaande graphische voorstellingen ziet men duidelijk hoe onder deze omstandigheden de figuur als een waaier in elkaar wordt geschoven. Hierdoor kan b.v. het hoogteverschil tusschen de krommen I + II en I + II + III gaan naderen tot de proeffout, en het quantitatief meten der factoren was dan onmogelijk.

Een enkele maal gaf een monster van ons gistras ook zonder toevoeging van bios meer dan 100 % toename van den groei (in plaats van de normale 30—40 %). In dat geval was de gist bruin-grijs en kleverig; het ligt vóór de hand aan te nemen, dat deze tamelijk veel dood celmateriaal bevatte, dat als bios-bron diende.

Nadat wij genoemde onaangename ervaringen hadden opgedaan verzochten wij het Institut für Gärungsgewerbe ons inlichtingen te geven over de oorzaak van de variceerende qualiteit der gist. Dit instituut deelde ons daarentrent het volgende mede: „... Die Hefe fällt je nach der Generation, die zum Versand kommt, etwas verschieden aus. Sie wird in den einzelnen Generationsstufen verschieden ernährt und zwar in den ersten Stufen ausschliesslich organisch, während in der letzten Stufe

die Hefe fast ausschliesslich anorganisch ernährt wird. In den ersten Generationsstufen ist die Hefe meist etwas grauer und die Konsistenz etwas zäher." Hiermede hadden wij de verklaring van het wisselend gedrag der gist. Het is immers zeer aannemelijk, dat de op organischen voedingsbodem gekweekte gist meer bios bevat dan de anorganisch gekweekte en dat daardoor de eerste soort minder sterk reageert op toegevoegd bios. Wij gebruikten daarna uitsluitend anorganisch gekweekte gist, hetgeen tot resultaat had, dat het aantal afwijkingen bij het meten sterk verminderde.

HOOFDSTUK III.

Eigen onderzoek.

Toen F. KÖGL en B. TÖNNIS in 1931 begonnen met hun onderzoek van bios, stond op grond van onderzoekingen van E. V. EASTCOTT alleen vast, dat bios I door meso-inosiet kon worden vervangen. Over het chemisch karakter der andere bios-factoren tastte men nog zeer in het duister en bovendien wist men ook nog niet of de voor een bepaald gist-ras werkzame factoren ook voor andere rassen beteekenis hadden en of b.v. onze „Heferasse M” eveneens meerdere bios-factoren voor haar groei nodig had. Het leek daarom de aangewezen weg bios eerst als enkelvoudige verbinding te beschouwen, totdat het verdwijnen der activiteit bij een bepaalde bewerking gedurende de zuivering op een splitsing in factoren zou wijzen. Een dergelijk verdwijnen der werkzaamheid trad echter niet op en het door F. KÖGL en B. TÖNNIS in 1934, na een drie millioen-voudige concentratie, in gekristalliseerden toestand verkregen biotine toonde ook zonder toevoeging van andere factoren een zeer groote activiteit. Nog voor dat de gekristalliseerde verbinding was verkregen, kon echter al aan onzuivere oplossingen van biotine worden geconstateerd, dat bij de zuivering een andere factor was afgescheiden. Deze was weliswaar op zichzelf niet werkzaam, maar verhoogde de activiteit van biotine-oplossingen aanzienlijk. Het lag voor de hand te onderzoeken of deze factor niet met meso-inosiet identiek was. Inderdaad kon deze meerwaardige alcohol

den afgescheiden factor ten deele vervangen. Het bleek, dat de scheiding tusschen biotine en bovengenoemden factor plaats heeft bij de behandeling der ruwe extracten met dierlijke kool¹⁾. Hierbij wordt het biotine aan de kool geadsorbeerd, terwijl bios I in oplossing blijft.

In dit stadium begon ik zelf aan het onderzoek deel te nemen; als eerste taak werd mij opgedragen na te gaan of inderdaad de bovenvermelde, niet aan kool adsorbeerbare factor, volkomen gelijk te stellen is met meso-inosiet.

EASTCOTT onderzocht diverse producten op hun gehalte aan bios I. Theestof bleek van deze producten het meest van genoemden factor te bevatten en werd daarom als uitgangs-product voor de isolatie van bios I gekozen.

Zij werkte volgens de methode van Lucas, scheidde bios I uit het thee-extract af door behandeling met bariet en alcohol en zuiverde de actieve fractie vervolgens door precipiteeren met loodacetaat en ammonia. Het loodneerslag werd ontleed en de verkregen bios I-oplossing met kool ontkleurd. EASTCOTT nam waar, dat de activiteit van deze oplossing drie maal zoo groot werd door koken met 20 % zoutzuur, terwijl gedurende deze bewerking veel bijproducten verkoolden. Na affiltreeren van een onoplosbare zwarte massa en nogmaals ontkleuren met kool werd de oplossing tot op een klein volumen ingedampt en hieraan langzaam methylalcohol toegevoegd. De actieve stof, die zich hierna afscheidde, werd vele malen omgekristalliseerd en bleek identiek te zijn met meso-inosiet.

Deze bewerking laat de mogelijkheid open, dat hierbij bios I verandert. Het zou b.v. kunnen zijn, dat inosiet

¹⁾ Het feit, dat een der bios-factoren aan kool is te adsorbeeren, werd het eerst terloops vermeld door W. L. MILLER in Science 59, 197 (1924) en uitvoeriger behandeld in Am. Soc. 55, 1502 (1933).

oorspronkelijk als phosphorzure ester aanwezig was. Deze zou bij de behandeling met 20 % zoutzuur zonder twijfel hydrolytisch worden gesplitst. In dit geval zou inosiet niet het origineele bios I zijn. Dat de behandeling met zoutzuur veranderingen teweeg kan brengen, blijkt trouwens uit EASTCOTT's vermelding van een door dit zuur veroorzaakte stijging van het gehalte aan bios I. Afgezien van het feit, dat door genoemde behandeling gevaar voor secundaire veranderingen bestond, leek het gewenscht, de actieve stof achteraf ook uit de oorspronkelijke bron — dus de gist — te isoleeren. Naar aanleiding van de publicatie van EASTCOTT doen zich dus de volgende vragen voor.

Is bios I uit gist identiek met bios I uit thee? Zoo ja, is dan inosiet als zoodanig verantwoordelijk voor de bios I-werking van gist-extract of hebben we te maken met een inosiet-derivaat?

Een antwoord op deze vragen is alleen te geven door de gist zoo voorzichtig mogelijk te verwerken en daarbij het gebruik van sterk ingrijpende reacties te vermijden.

Ten slotte rees de vraag of er nog andere chemisch eventueel op meso-inosiet gelijkende stoffen waren, die eveneens de werking van bios I vertoonen, dus of de activiteit van meso-inosiet op specifieke wijze met zijn constitutie samen hangt.

A. OVER HET AANTAL BIOS-FACTOREN VAN „HEFERASSE M”.

Reeds bij een der eerste zuiveringstrappen deed zich een moeilijkheid voor. Het bios I uit gist werd n.l. neergeslagen met loodacetaat en ammonia en het gevormde

neerslag met zwavelwaterstof van lood bevrijd. Het filtraat van het loodsulfide, toegevoegd aan den factor uit het kool-eluaat „verhoogde” de groeikromme. Voor het bereiken van de standaard-curve (600 %) moest aan het kool-eluaat echter 8 à 10 maal de berekende hoeveelheid (berekend op de oorspronkelijke concentratie van den factor in het uitgangsmateriaal) van dit filtraat worden toegevoegd. Dit was des te meer opvallend, omdat men bij een dergelijke „onschuldige” behandeling met loodacetaat en ammonia een quantitative opbrengst zou verwachten. Drie verklaringen waren mogelijk: 1°. Bij deze behandeling is 90 % van de actieve stof verloren gegaan. 2°. Bij de adsorptie of bij de elutie heeft de aan kool adsorbeerbare factor chemisch een verandering ondergaan. 3°. In het koolfiltraat bevindt zich nog een derde factor. Het volgende experimenteele onderzoek bewees, dat deze laatste veronderstelling de juiste was.

De gist verwerkte ik daartoe als volgt:

1 kg bakkersgist (koningsgist, Delft) werd met 3,5 l water gedurende een uur gekookt, waarna het extract door centrifugeeren werd gescheiden van het celmateriaal.

Meting 1:

„gist-extract”, bij verdunning tot 30 l: curve tot 600 %.

Bij deze en de volgende metingen zijn duidelijkheidshalve de uitkomsten vermeld in sterk afgeronde getallen. Het verdunningsgetal geeft aan tot hoever men een bepaald extract kan verdunnen, opdat 0,1 cc. daarvan nog een groei-toename van 100 % veroorzaakt, m.a.w. de *standaard-concentratie* bezit.

De oplossing werd in vacuo drooggedampt, waarbij

het hinderlijke schuimen kon worden vermeden door af en toe een spoortje n-decyl-alcohol toe te voegen. Na de indamprest te hebben opgenomen in weinig water, werd zooveel alcohol toegevoegd, dat de oplossing tenslotte 80 % hiervan bevatte. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd en het filtraat door indampen in vacuo van alcohol bevrijd.

Meting 2:

„alcoholisch filtraat”, bij verdunning tot 20 l:

curve tot 600 %.

Ondanks een verlies van ongeveer 30 %, blijken dus nog alle factoren aanwezig te zijn.

De rest van het „alcoholisch filtraat” werd opgenomen in 2 l water, aan deze oplossing werd 25 g (overmaat) loodacetaat, opgelost in weinig water toegevoegd en het gevormde neerslag afgefiltreerd. Een proefje van het filtraat bleek na verwijderen van het lood nog de volle activiteit te bezitten. Aan de rest van het filtraat werd ammonia toegevoegd, tot de overmaat lood was neergeslagen. Het precipitaat werd gecentrifugeerd, met water uitgewassen, vervolgens in 2 l water gesuspenderd en evenals het filtraat met zwavelwaterstof van lood bevrijd.

Meting 3:

„lood-neerslag”, bij verd. tot 20 l:

onwerkzaam.

„lood-filtraat”, „ „ „ „ 20 l:

curve tot 300 %.

„lood-filtr.+lood-neerslag”, beide in verd. tot 20 l:

curve tot 600 %.

De behandeling met loodacetaat en ammonia heeft

dus een scheiding in factoren te weeg gebracht, waarbij geen actieve substantie is verloren gegaan.

Het „lood-filtraat” werd volledig bevrijd van ammonia en lood, hierna verdund tot een volumen van 5 l en vervolgens tweemaal geschud resp. met 50 en 25 g kool. Na een half uur werd gefiltreerd, met water uitgewaschen en daarna geëlueerd met 0,1 N bariet in 60 % acetone (per g kool werden 20 cc. van deze oplossing gebruikt). Door indampen in vacuo en behandeling met verd. zwavelzuur werden uit het eluaat acetone en barium verwijderd.

Meting 4:

„kool-filtraat”, bij verd. tot 20 l:	onwerkzaam.
„kool-eluaat”, „ „ „ 20 l:	curve tot 300 %.
„kool-eluaat” (verd. 20 l) + „lood-neerslag” (verd. 20 l):	curve tot 480 %.
„kool-eluaat” (verd. 20 l) + „kool-filtraat” (verd. 20 l):	curve tot 300 %.
„kool-eluaat” (verd. tot 20 l) + „ ^{lood} kool-neerslag” (verd. 20 l)	
+ „kool-filtr.” (verd. 20 l):	curve tot 600 %.
„kool-eluaat” (verd. 20 l) + „lood-neerslag” (verd. 2 l):	curve tot 580 %.
„kool-eluaat” (verd. 20 l) + „kool-filtraat” (verd. 20 l) + inosiet:	curve tot 600 %.

Uit deze reeks metingen blijkt het volgende:

1°: Met de aan kool adsorbeerbare en de door loodacetaat en ammonia neergeslagen factoren is de werkzaamheid van een gist-extract niet volledig verklaard. Er bestaat dus nog minstens een derde factor.

2°: Deze derde factor kan worden

vervangen door de actieve substantie uit het „lood-neerslag” in 8 à 10-voudige overmaat toe te voegen.

3°: De factor uit het lood-neerslag kan worden vervangen door mesinosiet.

4°: Deze proeven geven een afdoende verklaring van het oogenschijnlijk verlies van 90 %, genoemd op blz. 47.

Wij onderscheidden onze factoren voorloopig als volgt:

De factor uit het lood-neerslag: bios I (corresp. met MILLER's bios I).

De factor uit het kool-eluaat: bios II (corresp. met MILLER's bios II-B, waaraan later door KÖGL en TÖNNIS de naam biotine werd gegeven).

De factor uit het koolfiltraat: bios III (corresp. met MILLER's bios II-A).

B. HET ISOLEEREN VAN BIOS I UIT GIST.

Om het onderzoek van bios I op quantitative wijze verder voort te kunnen zetten werd een maatstaf aangenomen, waarin de activiteit van een bios-I-preparaat was uit te drukken. Op grond van eenige voorloopige proeven bleek deze het best als volgt te definiëren: de hoeveelheid, die, gecombineerd met 1 cc. van een mengsel van bios II en -III in dubbele¹⁾ standaard-concentratie, dezelfde groeitoename veroor-

¹⁾ Door deze verdubbeling werd de gevoeligheid der methode aanmerkelijk verhoogd.

zaakt als 1 cc. van de standaardoplossing.

Het mengsel van bios II en III werd gemaakt uit het in meting No. 3 genoemde „lood-filtraat”, dat ik in een oplossing met 10 maal de vereischte concentratie (dus $20 \times$ de standaard-concentratie) gefractioneerd steriliseerde bij 100° en daarna in de ijskast bewaarde. Eerst

TABEL 3.

hoeveelh. inosiet toegevoegd aan Bios II + III	procentuele toename	hoeveelh. inosiet toegevoegd aan Bios II + III	procentuele toename
—	220	0.6 γ	408
0.01 γ	235	0.8 „	465
0.02 „	240	1.0 „	525
.04 „	231	2.0 „	560
.06 „	244	3.0 „	592
.08 „	234	4.0 „	600
0.1 „	250	5.0 „	610
0.2 „	265	10.0 „	618
0.4 „	340	standaard-oplossing	595

werd met behulp van deze oplossing de activiteit van zuiver inosiet (Merck) bepaald. Hoeveelheden varieerend van 0,01 tot 10 γ , werden ieder met 0,1 cc. van de steriele voorraadsoplossing gemengd en vervolgens met water tot 1 cc. verdund. Het resultaat van de metingen van de aldus verkregen oplossingen is in tabel 3 en fig. 3 samengevat.

De punten A en B in fig. 3 (blz. 52) geven de gisttoename aan, veroorzaakt resp. door 1 cc. van de oplossing der factoren II en III (in dubbele standaard-concentratie)

en van 1 cc. der tegelijkertijd gemeten standaard-oplossing. Hieruit blijkt volgens de bovengenoemde definitie,

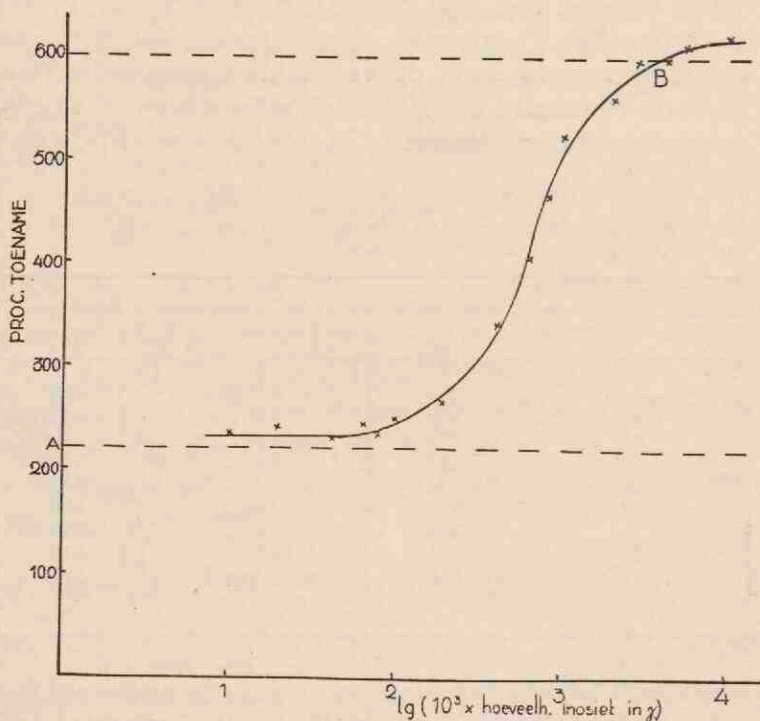


Fig. 3. De curve geeft aan, welke toename van den groei wordt veroorzaakt door toevoegen van verschillende hoeveelheden inosiet aan een constante hoeveelheid bios II + III.

dat meso-inosiet een activiteit heeft van 3 γ , terwijl reeds bij toevoegen van 0,25 γ een duidelijk effect is waar te nemen.

In fig. 4 is graphisch voorgesteld hoeveel inosiet men moet toevoegen aan wisselende concentraties bios II + III, om een

groei toename van 600 % te bereiken. Aan de eene zijde eindigt de lijn in een punt, waarbij de concentratie van bios II + III, aan de andere zijde in een punt, waarbij de inosiet-concentratie als beperkende factor optreedt. Punt D geeft de concentraties in de standaardoplossing, terwijl de ordinat van punt C de concentratie geeft van de factoren II en III in de oplossing waarmee bios I wordt gemeten.

Men dient dus in het oog te houden, dat uit het feit dat een oplossing de standaard-curve geeft, niet zonder meer het bios I-gehalte valt te concluderen, aangezien de werkzaamheid van een bepaalden bios-factor een functie is van de concentratie der andere factoren, waarmee hij in combinatie gemeten wordt.

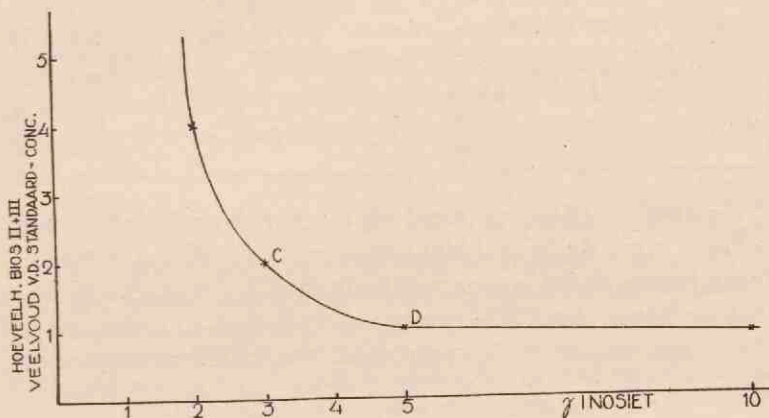


Fig. 4. De curve geeft aan welke combinaties van inosiet met de factoren II + III een toename van den groei van 600 % veroorzaken.

De activiteit van bios I-oplossingen werd op dezelfde wijze gemeten als inosiet en, om de dag-invloeden zoveel mogelijk uit te schakelen, steeds met inosiet-oplossingen vergeleken. Tabel 4 is een voorbeeld van een meting van bios I.

TABEL 4.

	Extinctie	% toename
Uitgangswaarde	2,5	
bios II + III	9,6	284
" " + 0,5 γ inosiet	13,8	452
" " + 1 " "	15,0	500
" " + 2 " "	16,7	568
" " + 3 " "	18,2	628
" " + 4 " "	18,9	656
bios II + III + 0,1 cc. bios I-opl.	13,5	440
" " + 0,2 cc. " "	14,7	488
" " + 0,3 cc. " "	16,3	552
" " + 0,4 cc. " "	17,8	612
" " + 0,5 cc. " "	18,6	644
Standaard-oplossing 0,1 cc.	5,6	124
" 0,3 cc.	9,7	288
" 0,5 cc.	15,6	524
" 1 cc.	18,3	632

De standaard-curve werd bij deze meting bereikt door 0.45 cc. van de bios I-oplossing met onbekend gehalte. Deze hoeveelheid correspondeert met 3 γ inosiet. De oplossing bevat dus 6,7 γ per cc.

De nauwkeurigheid van deze methode is ongeveer 20 %.

Om een voordelige bereidingsmethode te vinden onderzocht ik hoe men uit gist de beste opbrengst aan bios I krijgt en tevens welke methode het zuiverste en meest actieve product oplevert. Hierbij werd eveneens nagegaan hoeveel bios I werd meegesleept in het „alcohol-neerslag” (zie meting No. 2, blz. 48), waarvan quantiteit en samenstelling zeer uiteenlopend zijn bij verschillende methodes.

Het „alcohol-neerslag” werd hiertoe, evenals de hoofdfrac-tie uit het „alcohol-filtraat”, met loodacetaat en ammonia be-handeld. Het ontleden van het „lood-neerslag” bracht een moeilijkheid mede. Bij inleiden van zwavelwaterstof bleef het loodsulfide colloidaal in oplossing, waarschijnlijk door de in het „alcohol-neerslag” aanwezige eiwitten. Door toe-voegen van een gelijk volumen alcohol en een weinig zout-zuur was dit euvel te verhelpen.

Van de oplossingen, die voor verder verwerken niet in aanmerking kwamen, werd geen droogrest bepaald. In tabel 5 (blz. 56) werd daarom in plaats van de activiteit alleen de „hoeveelheid” bios I vermeld, welke hoeveelheid werd aangegeven door het aantal liters bios-oplos-sing met standaard-concentratie, die uit bovengenoemde oplossingen te bereiden waren. Deze getallen geven dus alleen quantiteit en geen qualiteit aan. Onderzocht wer-den door koken, door autolyse en door plasmolyse bereide gist-extracten.

De bereiding van bios I uit een door *koken* verkregen gist-extract werd reeds op blz. 47 van dit hoofdstuk besproken. Het *autolyse-extract* maakte ik op de volgende manier ¹⁾: 2 kg gist werden met 2 l water, 200 cc. toluol en 200 cc. aethyl-acetaat in een broedstoof gedurende 4 dagen op 35° C. ver-warmd en het mengsel af en toe krachtig geschud. Vervol-gens werd onder roeren langzaam 3 l alcohol toegevoegd en het daarbij gevormde neerslag afgecentrifugeerd. De oplos-sing werd in vacuo drooggedampt, de rest opgenomen in 300 cc. water en hieraan onder roeren 800 cc. alcohol toe-gevoegd. Na affiltreeren van een hoeveelheid uitgekristal-liseerde zouten werd het alcoholische filtraat drooggedampt en de rest op de gebruikelijke wijze behandeld met lood-acetaat (iets meer dan bij de kookmethode) en ammonia. Het *plasmolyse-extract* verkreeg ik door 1 kg gist te mengen met 100 g natriumacetaat. Na 24 uur werd het mengsel aange-

¹⁾ Zie T. PHILIPSON. H.S. 195, 81 (1931).

roerd met 2 l water en gecentrifugeerd. Het celmateriaal werd daarna nog eens met 2 l water uitgetrokken, vervolgens de vereenigde extracten in vacuo ingedampt en de rest op dezelfde manier verwerkt als het kook-extract.

Na het ontleden van de loodneerslagen werden alle bios I-oplossingen geschud met 2 g kool om sporen bios II te verwijderen en vervolgens in vacuo drooggedampt.

TABEL 5.

	Kook-extract			Autolyse-extr.			Plasmolyse-extr.		
	activiteit in γ	hoeveelheid in l standaard-opl.	hoeveelheid in mg.	activiteit in γ	hoeveelheid in l standaard-opl.	hoeveelheid in mg.	activiteit in γ	hoeveelheid in l standaard-opl.	hoeveelheid in mg.
Hoofdfractie	100	24	2308	30	108	3256	15	37	550
Alcoh. neerslag		50			125			3	
Totaal		74			233			40	

Het residu was in alle drie gevallen een lichtbruin stroopje, waaruit zich, ook bij lang staan, geen kristallen afzetten. Door drogen in vacuo boven phosphorpentoxide ontstond een harde, hygroscopische massa. Van de aldus gedroogde resten werd de activiteit bepaald. De resultaten zijn in tabel 5 samengevat en geven de opbrengsten aan uit 1 kg gist.

De autolyse-methode bleek verreweg de voordeeligste te zijn. De hiermede bereide fractie, met een werkzaamheid van 30 γ , vormde het uitgangsmateriaal, dat ik op verschillende manieren probeerde te zuiveren.

Allereerst trachtte ik dit te bereiken door de actieve stof herhaalde malen neer te slaan met loodacetaat, cadmiumnitraat en ammonia volgens MEILLÈRE en FLEURY ¹⁾. Dit gaf geen verhooging der werkzaamheid. Ook neerslaan met andere metaalzouten had weinig succes. De kleine hoeveelheden neerslag, die ontstonden door toevoegen van kwik- en koperacetaat waren inactief.

Een aantal gebruikelijke reagentia op alkaloiden gaf in verdunde oplossing geen neerslag; de in geconcentreerde oplossing gevormde precipitaten waren onwerkzaam.

Vergeefs trachtte ik een zuivering te verkrijgen door neer te slaan met bariet in alcoholisch milieu volgens LUCAS ²⁾.

Hiertoe werden 100 mg uitgangproduct opgelost in 40 cc. water en 4 g bariet, opgelost in 20 cc. water, toegevoegd. Hierin werden langzaam onder roeren 40 cc. alcohol gedruppeld. Na 10 uur werd het neerslag afgecentrifugeerd en gewassen met 60 % alcohol. Het filtraat + waschvloeistof werd evenals het neerslag bevrijd van alcohol en bariet. De droogrest van het neerslag was tweemaal zoo groot als die van het filtraat, terwijl de activiteit van beide resten dezelfde was als van het uitgangproduct. Ook bij herhaling van de proef vond ik, dat bios I door deze methode allerminst quantitatief wordt neergeslagen, hetgeen bij vroegere onderzoekers van invloed kan zijn geweest.

¹⁾ C. 1910¹, 1941.

²⁾ J. Phys. Chem. **28**, 1180 (1924).

Een beter resultaat werd verkregen door de actieve stof in een oplossing van het uitgangsmateriaal gefractionneerd neer te slaan met alcohol.

2,8 g autolyse-rest werden opgelost in 10 cc. water en onder roeren langzaam 25 cc. alcohol toegevoegd. Na 6 uur werd het neerslag (440 mg = rest 1) afgezogen en nagewassen met 15 cc. 70 % alcohol. Aan filtraat + waschvloeistof werd opnieuw 50 cc. alcohol toegevoegd. Na 24 uur staan in de ijskast had zich 730 mg (= rest 2) van een visceuse massa afgescheiden. De bovenstaande vloeistof gaf na afschenken en indampen een droogrest van 1,62 g (= rest 3).

De resten 1, 2 en 3 werden gemeten en hadden een activiteit van resp. 90, 50 en 20 γ . De zuiverste fractie (3) was op geen manier tot kristalliseeren te brengen.

Een analoge behandeling met aceton had ongeveer hetzelfde resultaat. Neerslaan met aceton na fractionneeren met alcohol gaf geen verbetering.

Ik trachtte het product met een activiteit van 20 γ na intensief drogen in hoogvacuum te distilleeren. Bij een vacuum van 0,01 mm sublimeerde na langzaam verwarmen tot 360° alleen een weinig benzoëzuur; de rest verkoalde.

Vergeefs waren ook de pogingen om bios I te adsorbeeren aan voller's aarde, silicagel en permutiet.

Vervolgens probeerde ik of de eigenschappen der inactieve begeleidende stoffen waren te veranderen door oxydatie. Het was n.l. gebleken, dat het uitgangspproduct reducerend werkte op Fehling's proefvocht en op een ammoniakale zilveroplossing, terwijl de activiteit door deze reacties niet werd beïnvloed.

Daar inosiet kan worden aangetast door ammoniakaal zilver, werd gebruik gemaakt van FEHLING's proefvocht. Na de

oxydatie werd het gevormde Cupro-oxyde afgefiltreerd en het reactiemengsel geneutraliseerd met zoutzuur. Het koper werd verwijderd met zwavelwaterstof, het filtraat tot een klein volumen ingedampt en de daarin opgeloste stoffen met alcohol gefractionneerd neergeslagen. Uit de actieve fractie was geen product te krijgen met een hogere werkzaamheid dan 30 γ .

Tenslotte nam ik mijn toevlucht tot acetyleeren, hoewel deze methode minder „einwandfrei” was dan de tot nu toe gebezigde precipitatie- en adsorptie-reacties.

100 mg van een preparaat met een activiteit van 20 γ werden met 5 cc. versch gedistilleerd azijnzuur-anhydride gedurende 45 min. op een waterbad verhit. Na affiltreeren van 7 mg van een onoplosbare witte stof werd in vacuo zooveel mogelijk vloeistof verdampt. Het na de acetyleering verkregen residu woog 148 mg. Dit werd opgenomen in 5 cc. chloroform en daarna werd de oplossing drie maal uitgeschud met 5 cc. water. Deze laatste extracten hadden een gezamenlijke droogrest van 47 mg. De rest was oplosbaar in absoluten alcohol en bleek bij meten onwerkzaam te zijn. De chloroform bevatte 98 mg van een eveneens onwerkzaam product. Beide resten werden verzeept door met 15 cc. 5% zwavelzuur gedurende 30 min. te verhitten op een waterbad. Na verwijderen van het zwavelzuur werd de activiteit gemeten. Van de chloroform-rest was deze 30 γ en van het waterig extract 10 à 15 γ , terwijl van bios I na acetyleeren en verzeepen in totaal 35% werd teruggewonnen.

De droogrest van het waterige extract was het eerste preparaat, dat de reactie op inosiet volgens SALKOWSKI¹⁾ duidelijk positief vertoonde; bij producten met een activiteit van 20 γ en minder was de uitkomst van deze reactie steeds zeer weinig overtuigend geweest. Het in-

¹⁾ Zie o.a. H.S. 86, 478 (1910).

tensief gedroogde preparaat werd hierna nog eens geacetyleerd volgens E. G. GRIFFIN en J. M. NELSON¹⁾ met acetylbromide, waarin het na een half uur koken volledig oploste. Vervolgens werd het reactieproduct uitgegoten in ijswater en deze oplossing met chloroform uitgeschud. Het extract werd gedroogd en ingedampt tot een kleine rest, waarin zich kristallen afzetten, die na twee maal omkristalliseeren identiek bleken te zijn met het hexa-acetaat van meso-inosiet.

smp. inosiet-hexa-acetaat	: 212°.
smp. van het product uit gist	: 210°.
mengsmeltpunt	: 211°.

Na verzeepen van 50 mg van dit product kon inderdaad een kleine hoeveelheid inosiet worden geïsoleerd, die, evenals het preparaat van Merck, een activiteit had van 3 γ .

smp. inosiet Merck	: 217°.
smp. van het product uit gist	: 216°.
mengsmeltpunt	: 216—217°.

Voor de analyse werd de stof bij 100° in vacuo gedroogd boven phosphorpentoxyde.

C-H-Analyse²⁾:

4,367 mg stof gaven 6,384 mg CO ₂ en 2,594 mg H ₂ O.	
berekend voor C ₆ H ₁₂ O ₆ : C 40,00 %; H 6,67 %.	
gevonden	: C 39,87 %; H 6,61 %.

¹⁾ Am. Soc. 37, 1556 (1915).

²⁾ Deze micro-analyse werd uitgevoerd bij DR. A. SCHOELLER, Berlin-Schmargendorf.

Noch uit het autolyse-, noch uit het plasmolyse-extract was het mogelijk een grootere opbrengst van zuiver hexa-acetaat te krijgen dan $\pm 10\%$, aangenomen, dat de totale bios I-werkzaamheid was te danken aan inosiet. Deze laatste veronderstelling kon evenwel meer aannemelijk worden gemaakt door de volgende proeven.

Een hoeveelheid van een bios I-preparaat met een werkzaamheid van 30γ werd gedurende een uur gekookt met overmaat acetylbro-mide, waarin het bijna geheel oploste. Vervolgens werd in vacuo zoo ver mogelijk ingedampt en de achterblijvende rest verzeept door koken met 5% zwavelzuur. De activiteit bleek na deze bewerkingen geheel onveranderd te zijn, waarmee is bewezen, dat bios I door de voor de isolatie gebezigde acetylerings-methode geen chemische veranderingen heeft ondergaan.

Hetzelfde preparaat werd gedurende 24 uur gekookt met 20% zoutzuur. Daarna werd de vloeistof in vacuo drooggedampt, de rest in water opgenomen en deze oplossing gefiltreerd. Ten slotte werd ontkleurd met een weinig kool. Ook in dit geval was de werkzaamheid geheel gelijk gebleven.

Het is dus in hooge mate waarschijnlijk, dat bios I uit gist-extract identiek is met meso-inosiet.

In verband met het bios I-vraagstuk werd nog het volgende onderzocht:

1°. Uit tabel 5 volgt, dat men door autolyse ongeveer driemaal zooveel bios I uit gist krijgt als door koken. Ik trachtte nu uit te maken of deze stof door de fermentatieve destructie der cellen gemakkelijker kan vrijkomen

dan door koken of dat bij autolyse *nieuw* inosiet wordt gevormd. Daartoe werd bij beide methodes zoowel het celmateriaal als het extract ontleed door koken met 20 % zoutzuur, vervolgens werd het inosiet van de andere factoren gescheiden met loodacetaat en ammonia en het bios I-gehalte gemeten van het neerslag. Uit tabel 6, waarin de resultaten zijn samengevat, blijkt dat bij autolyse het grootste quantum inosiet (uitgedrukt in milligrammen per gram gist) zich in het extract, en slechts een klein gedeelte zich in het celmateriaal bevindt. Bij koken van gist is het juist omgekeerd.

TABEL 6.

	mg nosiet per g gist volgens:		
	autolyse-methode	kook methode	directe bepaling
Celmateriaal.	0,132	1,0	
Filtraat.	0,9	0,2	
Totaal.	1,032	1,2	1,24

Ook het gehalte van bios II en III liet zich — ondanks het koken met zoutzuur — bepalen. Hoewel in combinatie met inosiet geen standaard-curve werd verkregen, was toch een onderlinge vergelijking mogelijk. Het gehalte aan de factoren II en III bleek *evenredig* te zijn met dat van inosiet.

Blijkbaar komt de inhoud der cellen gemakkelijker vrij door autolyse dan door koken. Er is voorloopig geen reden om aan te nemen, dat bij autolyse nieuw inosiet wordt gevormd.

2°. Bij het begin van het onderzoek van bios I had ik

mij afgevraagd of er nog andere, chemisch eventueel op inosiet gelijkende, stoffen waren, die eveneens de werking van bios I vertoonden. Met dit doel had MILLER¹⁾ reeds een aantal meerwaardige alcoholen onderzocht en, naar aanleiding van het negatieve resultaat, gewezen op het feit, dat *de activiteit van meso-inosiet blijkbaar op specifieke wijze verband houdt met zijn constitutie.*

Het leek mij van belang om ook voor de door ons gebruikte „Heferasse M” na te gaan of andere meerwaardige alcoholen geheel of gedeeltelijk in staat zijn meso-inosiet te vervangen. De volgende stoffen werden gemeten en *inactief* bevonden: adoniet, arabiet, dulciet, erythriet, manniet, l-inosiet, scylliet en sorbiet. Aanvankelijk werd bij l-inosiet en scylliet een zwakke bios I-werking aangetoond. Na vijf maal omkristalliseeren waren beide stoffen echter inactief. Ook phytine bleek onwerkzaam te zijn.

3°: Het inosiet-gehalte werd bepaald van gistcellen, die zich op een „synthetische” voedingsbodem hadden ontwikkeld.

50 mg gist werd geënt op 250 cc. voedingsoplossing met de volgende samenstelling:

water	240	cc.
glucose	22,5	g
KH ₂ PO ₄	1	„
MgSO ₄ . 8 H ₂ O	0,5	„
NH ₄ NO ₃	1,9	„
CaCl ₂	0,08	„

Deze cultuur werd in een broedstoof gedurende 6 dagen geschud bij een temperatuur van 30° C. In dien tijd

1) J. Chem. Education. 7, 257 (1930).

hadden zich ongeveer 800 mg gist gevormd, die met zoutzuur werden gedeutereerd en op de gebruikelijke manier verder werden behandeld. Het inosiet-gehalte bleek 500 γ te bedragen. Daar de gist per milligram ongeveer 15.000.000 cellen bevat, komt dit overeen met $0,4 \times 10^{-13}$ g. inosiet per cel.

Uit tabel 5 volgt, dat onder normale omstandigheden gekweekte gist $0,8 \times 10^{-13}$ g inosiet per cel bevat. Deze getallen stemmen goed overeen met die van EASTCOTT¹⁾. Zij vond resp. 0,5 en $1,2 \times 10^{-13}$ g per cel.

Ten slotte zij opgemerkt, dat deze biochemische methode voor de quantitative bepaling van inosiet, vooral van kleine hoeveelheden en bij aanwezigheid van veel verontreinigingen, belangrijk sneller en nauwkeuriger is dan de gebruikelijke methodes²⁾, waarbij men noodzaak is inosiet als zodanig af te scheiden. Tot nu toe is echter nog niet bewezen, dat inosiet de eenige stof is, die de bios I-werking vertoont. De specificiteit van de methode zou dus nog nader dienen te worden gecontroleerd.

C. ONDERZOEK VAN BIOS III.

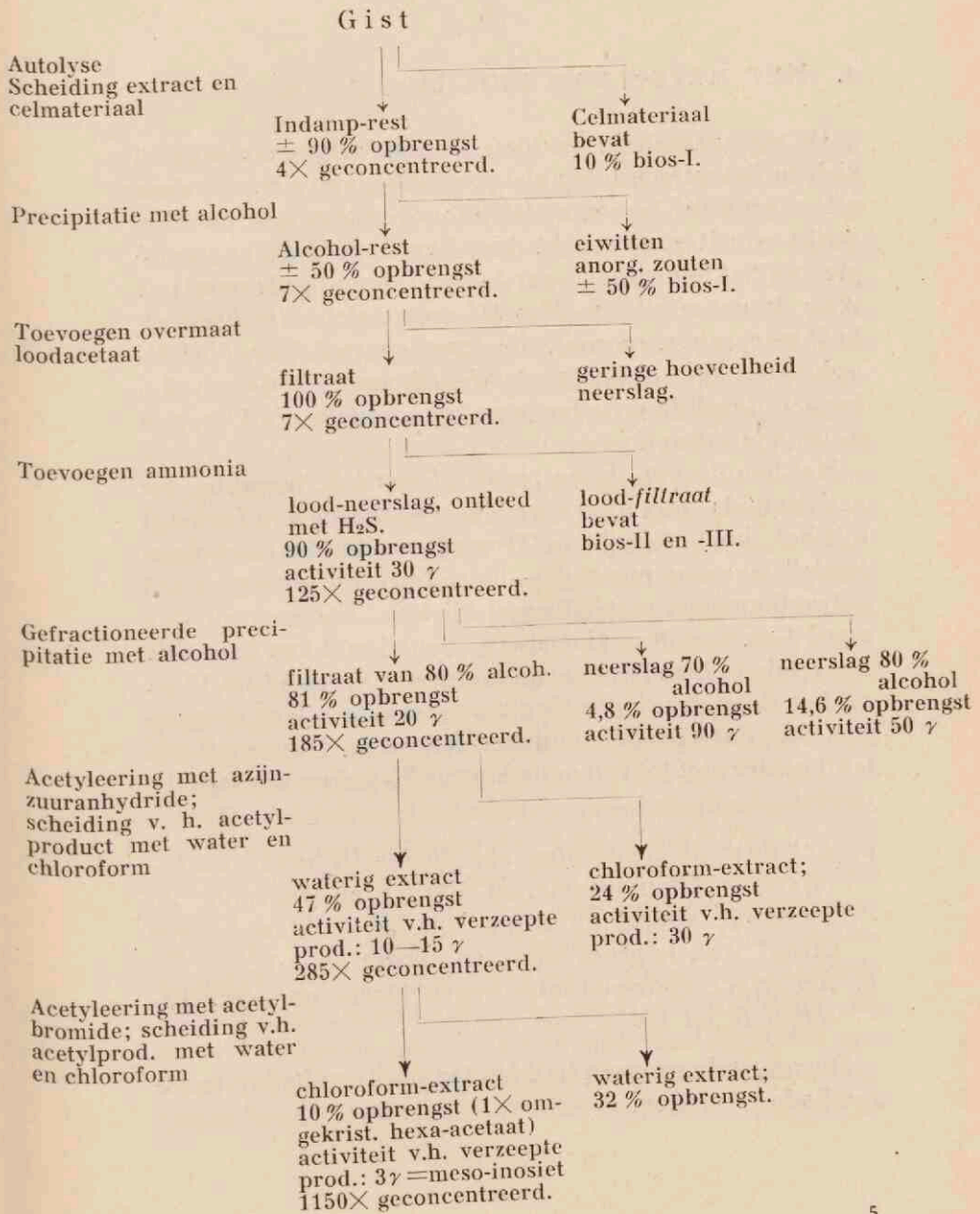
Uit meting 4 op blz. 49 bleek, dat het door een gistextract veroorzaakte effect niet voldoende wordt verklaard door de werkzaamheid van de factoren I en II, en dat voor het bereiken van de standaard-curve nog een derde stof (of complex van stoffen) noodzakelijk is, welke zich bevindt in het „kool-filtraat”. Deze stof (of complex van stoffen) noemden wij bios III.

¹⁾ J. Phys. Chem. **32**, 1094 (1928).

²⁾ Zie b.v. L. B. WINTER, Biochem. J. **28**, 6 (1934).

TABEL 7.

OVERZICHT VAN HET ISOLEEREN VAN BIOS I.



1. HET METEN VAN BIOS III.

De werkzaamheid van den derden factor manifesteert zich in het verschil der gist-productie, veroorzaakt door alle factoren tezamen (standaard-oplossing) en die, welke wordt veroorzaakt door bios I en II. Naar analogie van het onderzoek naar factor I, nam ik als maatstaf voor de *activiteit van bios III-preparaten: die hoeveelheid van een preparaat, die tezamen met 1 cc. bios II-oplossing van dubbele standaard-concentratie en 5 γ inosiet, dezelfde groeitoename veroorzaakt als 1 cc. van de standaard-oplossing.*

Met behulp van dezen maatstaf werd de bepaling der activiteit als volgt uitgevoerd. Een oplossing van factor II (uit het „kool-eluaat”) in 20-voudige „standaard-concentratie”, waaraan per cc. 50 γ inosiet was toegevoegd, werd gefractionneerd gesteriliseerd bij 100°. Voor een meting werd 1 cc. van deze vloeistof gemengd met een bepaalde hoeveelheid bios III, daarna met water verdund tot 10 cc. en het door deze oplossing veroorzaakte effect vergeleken met dat van de standaard-oplossing. Deze methode leidt echter niet tot een nauwkeurige bepaling van bios III, omdat

- a. *het door de toevoeging van factor III veroorzaakte effect te klein (maximaal 150 %) en daardoor de meetfout, vooral op dagen dat de standaard-curve „laag” was, te groot werd, en verder omdat*
- b. *het effect, door een later opgehelderde oorzaak, tusschen 10 en 150 % varieerde.*

De volgende proeven hadden ten doel een betere meetmethode te vinden.

De scheiding van bios II en III.

Verondersteld werd, dat bij de tot nu toe gevolgde scheidingsmethode factor II verontreinigd bleef met een hoeveelheid bios III en dat een volledige scheiding het door laatstgenoemden factor veroorzaakte effect moest vergrooten. Het was dus van belang iets naders te weten te komen over de *mate*, waarin factor drie aan kool wordt geadsorbeerd. De experimenten hadden tot dusver alleen geleerd, dat bios II *gemakkelijker* wordt „uitgeschud” dan de derde factor. Het was evenwel niet uitgesloten, dat door een teveel aan kool een zekere hoeveelheid van dezen factor wordt meegesleept. Ter toetsing van deze veronderstelling werd een proef genomen om met meerdere zekerheid factor II van bios III te bevrijden. De oplossing van tweeden en derden factor werd met een hoeveelheid kool geschud, die hoogstens toereikend was om de helft bios II (fractie a) te adsorbeeren. Uit het filtraat werd de resterende tweede factor met overmaat kool verwijderd (fractie b). Ten opzichte van bios III en inosiet vertoonden de beide fracties echter niet het minste verschil.

Ook werd een aantal adsorptie-proeven uitgevoerd met varieerende concentraties der actieve stoffen en bij wisselende p_H . Hierbij werden alle mogelijke combinaties „getest”, zooals b.v. een uit zuur milieu geadsorbeerde factor II met een in basisch milieu achtergebleven factor III en vice versa. Geen dezer proeven veranderde iets aan de eigenschappen van bios II, waaruit volgt, dat of de eventuele adsorptie van den derden factor aan kool door geen der bij die proeven gekozen omstandigheden wordt verhinderd, of dat de fractie van bios II

inderdaad niet in staat is een grooter effect te veroorzaken.

Een viermaal met hetzelfde preparaat herhaalde adsorptie en elutie van den tweeden factor leverde evenmin iets nieuws op. Ook voorzichtig uitwasschen van de bios II bevattende kool met water en met 50 % alcohol gaf niet het gewenschte resultaat. In den alcohol loste een hoeveelheid stof op, die een deel van het bios II bevatte; de eigenschappen van den tweeden factor in het eluaat der uitgewasschen kool waren echter vrijwel onveranderd gebleven.

Door de concentraties van bios II en van inosiet ieder afzonderlijk of tegelijkertijd te verhoogen, werd het door factor III veroorzaakte effect niet grooter.

Het uitwasschen der gist.

Er bestond een mogelijkheid, dat de wisselvalligheid der meet-resultaten te wijten was aan vrij bios III, ontstaan uit celmateriaal dat tijdens het bewaren afgestorven was. De gist werd daarom eenige malen met water uitgewasschen, hetgeen echter tot eenig gevolg had, dat de standaard-curve „daalde”, terwijl het door factor III veroorzaakte effect eerder kleiner dan grooter werd.

Een „pro-bios III” oorzaak van het variabele effect?

Herhaaldelijk was gebleken, dat gesteriliseerde oplossingen van bios II, na eenigen tijd in de ijskast bewaard te zijn geweest, een verandering hadden ondergaan. Door toevoegen alleen van inosiet — en wel zonder bios III — vertoonden de metingen dezer oplossingen reeds de

standaard-curve. Bios III scheen in zulke gevallen dus overbodig te zijn. Aanvankelijk meende ik dit te moeten toeschrijven aan een infectie door bacteriën in een enkel kolfje. Daar het verschijnsel evenwel herhaaldelijk optrad en in de bewuste kolfjes, ook bij microscopisch onderzoek, nooit micro-organismen waren aan te toonen,

TABEL 8.

Tijd verlopen na het uitvoeren der scheiding	Bios II	Bios II + inosiet	Bios II + inosiet + Bios III	Verskil tusschen de twee vorige kol.	Bios II + inosiet + nieuw kool-filtraat ontstaan bij e
1 uur (a)	283	433	580	147	
1 dag (b)	260	541	591	50	
4 dagen (c)	285	554	580	26	
8 dagen (d)	270	575	584	9	
Opnieuw gescheiden (e)	273	440	576	136	583
Na 4 dagen (f)	281	525	581	56	

moest er een andere oorzaak zijn. Om deze na te gaan mat ik vier maal achtereenvolgens, met verschillende tusschenpoozen, combinaties van inosiet en opnieuw gescheiden bios II en III. Het resultaat wijst op een chemische verandering in de bios II-oplossingen, zooals blijkt uit tabel 8, waarin de getallen de door de oplossingen veroorzaakte procentueele toename van den groei aangeven.

Een dergelijke reeks metingen werd viermaal herhaald, steeds met hetzelfde gevolg. De meting e bewijst, dat bios II niet chemisch verandert daar deze factor,

direct gemeten na herhaalde adsorptie en elutie, weer de oorspronkelijke gevoeligheid ten opzichte van bios III vertoont. In de bios II-oplossing is echter nieuw bios III ontstaan, hetgeen aangetoond werd door de werkzaamheid van het kool-filtraat, verkregen door de herhaalde adsorptie (zie laatste kolom van tabel 8). Het ontstaan van nieuw bios III vooronderstelt de aanwezigheid van een „*pro-bios III*” in de bios II-oplossing. Het nieuw gevormde bios III verhoogt de door de bios II-oplossing veroorzaakte groei-toename, stoort dus de bepaling van bios III en wel toenemend naarmate de bios II-oplossing ouder wordt. Deze toenemende storing verklaart het variabele effect der bios III-metingen, dat in zijn oorzaak dus moet worden toegeschreven aan het zoo even bedoelde *pro-bios III*.

De *pro-factor* wordt pas in bios III omgezet, nadat hij van deze laatste stof is gescheiden. Men denkt daarbij onwillekeurig aan een evenwicht, dat door overmaat bios III naar links wordt verplaatst, wanneer men voor de omzetting de volgende vergelijking opstelt: *pro-bios III* \rightleftharpoons bios III. Door overmaat bios III wordt de reactie naar links gedrongen, terwijl pas na verwijderen van dezen factor een omzetting naar rechts mogelijk is. Deze voorstelling van zaken wint aan waarschijnlijkheid door meting f (tabel 8), waaruit blijkt, dat na een herhaald verwijderen van bios III opnieuw een omzetting wordt mogelijk gemaakt.

Getracht werd de *pro-factor* totaal te ontleden door bios II met tusschenpoozen van vier dagen telkens te adsorberen en weer te elueeren. Gedurende deze tusschenpoozen kreeg *pro-bios III* n.l. de gelegenheid zich om te zetten in bios III. Door dit laatste iederen vierden

dag af te zonderen in het kool-filtraat hoopte ik bovenstaande reactie aflopend te kunnen maken en zoodoende een voor het meten beter geschikt bios II in handen te krijgen. Na een vijf maal herhaalde adsorptie ontstond een product, dat weliswaar gedurende eenige weken constante resultaten leverde, maar uiteindelijk zijn gevoeligheid ten opzichte van bios III toch weer verloor. Dit onderzoek werd niet verder voortgezet.

Het gebruik van bios II uit eieren.

F. KÖGL en B. TÖNNIS hadden aangetoond, dat het uit eigeel geïsoleerde biotine in combinatie met inosiet een toename van den groei veroorzaakt van ten hoogste 300 à 350 %, terwijl het effect van den gist onder dezelfde omstandigheden 400 à 500 % bedraagt. Dit gaf mij aanleiding na te gaan op welke wijze de groeikromme van bios II uit eieren in tegenwoordigheid van inosiet, wordt beïnvloed door bios III. Hierbij bleek de additieve groeitoename, evenals bij bios II uit gist, slechts ongeveer 150 % te bedragen, maar het effect was constant. Door het gebruik van bios II uit eieren ondervangt men derhalve het bezwaar van het variabele effect, dat aan bios II uit gist eigen is.

Meting 5:		
bios II (eieren)		240 %
" " + inosiet		326 %
" " + " + bios III (gist)		431 %
„standaard-oplossing”		634 %

Bij deze proeven bleek tevens, dat ook bij toevoegen van grootere hoeveelheden derden factor en inosiet, de

standaard-curve nooit wordt bereikt. De uit deze meting voortvloeiende conclusies worden uitvoeriger behandeld op blz. 93.

Het verlengen van den kweek-tijd.

Hoewel de methode door het meten met bios II uit eieren dus ten deele bruikbaar was geworden, was de grootte van het veroorzaakte effect niet toegenomen. Door de hieronder beschreven proeven slaagde ik erin ook dit bezwaar weg te nemen.

Tot dusverre had ik mij bij het quantitatief bepalen der bios-factoren gehouden aan de in hoofdstuk II beschreven werkwijze en dus — zulks terwille van de vergelijkbaarheid der resultaten — steeds dezelfde gistsoort en denzelfden voedingsbodem gebruikt en evenmin was ik afgeweken van den kweektijd van 5 uren. Daar echter reeds zoovele pogingen tot het vinden van een geschikte meet-methode van bios III hadden gefaald, leek het mij toch van belang een oplossing van het vraagstuk te zoeken door de werkwijze in dit opzicht te wijzigen.

Het gebruik van een andere gistsoort was voorloopig natuurlijk niet wenschelijk, aangezien „Hefe-rasse M” nu eenmaal het uitgangspunt van ons onderzoek was. Ik verlengde daarom den kweektijd. Daar de mogelijkheid bestond, dat de oplossing van READER hiervoor niet genoeg voedingsstoffen zou blijken te bevatten, werden bovendien de metingen tegelijkertijd uitgevoerd met den voedingsbodem van CLARK, die o.a. ook werd gebruikt door MILLER¹⁾ voor een kweektijd van 24 uur. Deze oplossing heeft de volgende samenstelling:

¹⁾ W. LASH MILLER. Am. Soc. 55, 1502 (1933).

H ₂ O	290	cc.
KH ₂ PO ₄	1,5	g
MgSO ₄ aq.	0,75	„
NH ₄ NO ₃	3	„
CaCl ₂ anh.	0,125	„
Glucose	36	„

Het belangrijkste verschil met de oplossing van READER is een tienvoudig gehalte aan glucose en een drievoudige hoeveelheid der anorganische zouten.

TABEL 9.

	Voed.opl. READER		Voed.opl. CLARK	
	na 5 u.	na 10 u.	na 5 u.	na 10 u.
Zonder bios	40	85	61	115
Bios II (gist)	275	983	305	584
„ „ + inosiet	392	1300	358	1268
„ „ + „ + Bios III	542	1780	552	2826
Standaard-oplossing	610	1700	625	2710

TABEL 10.

Metingen met voed.opl. v. CLARK	5 uur	10 uur	15 uur	20 uur	25 uur
Zonder bios	66	125	200	310	480
Bios II (gist)	387	560	1433	2727	3220
„ „ + inosiet	447	1433	3153	4160	4250
„ „ + „ + Bios III	647	3360	4373	4433	4387
Standaard-oplossing	665	3412	4410	4504	4481

De uitkomsten der proeven zijn samengevat in de

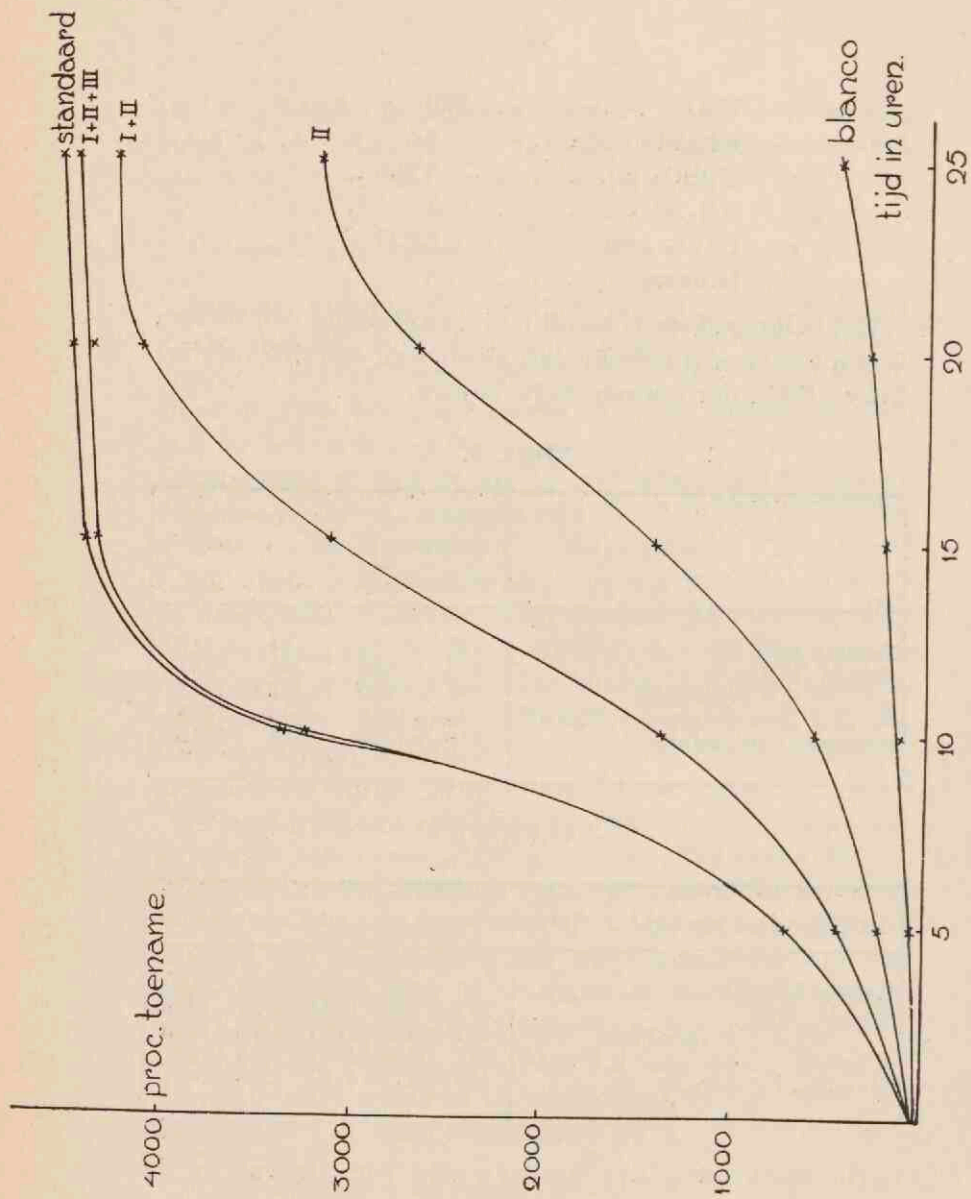


Fig. 5. Toename van den groei, veroorzaakt door oplossingen van bios II, bios I + II, bios I + II + III en de „standaard-oplossing“, na verschillende kweektijden bij gebruik van den voedings-bodem van CLARK.

tabellen 9 en 10, waarin de getallen de waargenomen procentueele toename aangeven. De resultaten uit tabel 10 worden verduidelijkt door de graphiek in fig. 5. De hierin afgebeelde krommen zijn vergelijkbaar met de lijn DE uit fig. 1.

Deze proeven werden genomen met versche (één dag van te voren gescheiden) oplossingen van de factoren II en III uit gist. Zij geven aanleiding tot de onderstaande gevolgtrekkingen.

1. Het door bios III veroorzaakte effect wordt aanmerkelijk grooter door het verlengen van den kweektijd. Bij de gegeven concentraties der bios-factoren wordt het beste resultaat bereikt door een kweektijd van 10 uren.

2. Dit resultaat werd bereikt zoowel op den voedingsbodem van READER als op dien van CLARK, maar het effect op laatstgenoemden was het grootst.

De verlenging van den kweektijd werd nu herhaald met bios II uit eieren. Zooals te verwachten was, werden hierdoor minder sterke groei-effecten waargenomen, die echter onderling dezelfde verschillen vertoonden als bij het gebruik van bios II uit gist, zooals blijkt uit meting 6.

Meting 6 (met voed. opl. van CLARK):

bios II (eieren) + inosiet	530 %
„ „ + „ + bios III (gist)	1925 %
standaard-oplossing	3240 %

Gebleden is thans, dat het gebruik van bios II uit eigeel met verlengden kweektijd een alleszins bruikbare methode voor de bepaling van bios III oplevert.

Door de in de meet-methode aangebrachte veranderingen werd het nu echter noodig een nieuwe maatstaf te zoeken voor de activiteit van bios III. Vergelijken met de standaard-curve, zooals dit bij het onderzoek van bios I geschiedde, was bij het toepassen van bios II uit eieren niet meer mogelijk. Ik bereidde daarom een *standaard-oplossing van bios III*, welker verschillende verdunningen, bij gebruik van den voedingsbodem van CLARK, een groei-toename veroorzaakten, die begon bij $\pm 550\%$ (hoogste waarde bereikt door bios II + inosiet) en steeg tot $\pm 2000\%$. Het gunstigste traject voor het verrichten van reproduceerbare metingen lag tusschen 580 en 950 %. Deze laatste waarde werd bereikt door meten van 1 cc. van een oplossing, waarin zich bevonden

1. 5γ inosiet,
2. bios II (gezuiverde preparaat 519b van TÖNNIS¹⁾ met 36.000.000 S.E. per g) in dubbele standaard-concentratie²⁾.
3. 0,05 cc. standaard-oplossing van bios III (overeenkomend met 25γ droog standaard-preparaat)³⁾.

De activiteit van een bios III-houdende stof werd aangegeven door die hoeveelheid van die stof, welke na een kweektijd van 10 uur dezelfde groeitoename veroorzaakt als 0,05 cc.

¹⁾ Het spreekt vanzelf, dat deze onderzoekingen later herhaald zullen moeten worden met gekristalliseerd biotine. Dit was ten tijde van mijn onderzoek nog niet in voldoende hoeveelheid beschikbaar.

²⁾ Van 1) en 2) gecombineerd werd een steriele voorraadsoplossing met de tienvoudige concentratie gemaakt. Deze werd evenals de standaardoplossing van bios III in de ijskast bewaard.

³⁾ Voor de bereiding hiervan zie blz. 81.

der standaard-oplossing van bios III, wanneer deze beide oplossingen (in bovengenoemde concentraties) worden gecombineerd met inosiet en bios II. Met de standaard-oplossing van bios III werden dus alle te onderzoeken preparaten vergeleken. Tabel 11 is een voorbeeld van een bios III-meting.

TABEL 11.

	Extinctie	% toename
Uitgangswaarde	2,4	
Bios II + 5 γ inosiet	15,0	525
" + " + bios III-preparaat 400 γ /cc.		
" + " + " " " " 0,01 cc.	17,6	635
" + " + " " " " 0,02 cc.	19,7	719
" + " + " " " " 0,03 cc.	21,6	800
" + " + " " " " 0,04 cc.	25,0	941
" + " + " " " " 0,05 cc.	26,7	1013
Bios II + 5 γ inosiet + stand.opl. bios III 500 γ /cc.		
" + " + " " " " 0,01 cc.	16,8	598
" + " + " " " " 0,02 cc.	18,9	687
" + " + " " " " 0,03 cc.	20,5	756
" + " + " " " " 0,04 cc.	22,2	825
" + " + " " " " 0,05 cc.	24,8	934

De activiteit van het preparaat werd hieruit op de volgende manier berekend. 0,04 cc. van de bios III-oplossing met onbekend gehalte correspondeert met 0,05 cc. van de standaard-oplossing. Aangezien de oplossing van het gemeten preparaat 400 γ vaste stof per cc. bevat, is de activiteit hiervan dus 16 γ .

2. HET UITGANGS-MATERIAAL.

Op blz. 49 werd aangetoond, dat de derde factor zich bevindt in het „kool-filtraat”. Het isoleeren van bios III uit deze vloeistof brengt, onverschillig welk uitgangsmateriaal men gebruikt, in het algemeen twee moeilijkheden met zich mede. Het bevat n.l. in de eerste plaats onvermijdelijk alle inactieve begeleidende stoffen van het oorspronkelijke bios-extract, behalve die, welke zich door loodacetaat en ammonia en door 80 % alcohol laten neerslaan, en die, welke door kool worden geabsorbeerd. In de tweede plaats treft men er in aan een vrij groote hoeveelheid ammonium-acetaat, ontstaan door de afscheiding van bios I. Aangezien dit ammonium-acetaat zeer moeilijk is te verwijderen, deed ik eenige pogingen om inosiet op een andere wijze uit de oplossing af te scheiden. Het lag voor de hand dit te probeeren met bariet en alcohol volgens LUCAS. Hierbij is mij gebleken, dat volgens deze methode bios I op zeer onvolledige wijze neerslaat. Zelfs na een twee maal herhaalde behandeling was in het filtraat nog duidelijk inosiet aan te toonen. Ook trachtte ik inosiet uit de oplossing te verwijderen met versch geprecipiteerd loodhydroxyde. Het gewenschte resultaat werd hierdoor echter niet bereikt.

Tenslotte werd deze moeilijkheid voorloopig aldus opgelost. Door meten werd vastgesteld, dat de groei-toename, veroorzaakt door een oplossing van bios I, II en III, niet noemenswaard stijgt, wanneer men hieraan 2 à 3 maal zooveel inosiet toevoegt. Hieruit volgt, dat een zeker inosiet-gehalte van een bios III-preparaat het meten van dezen laatsten factor niet zal beïnvloeden. Daar eenige milligrammen inosiet als begeleidende stof minder on-

aangenaam zijn dan vele grammen ammonium-acetaat, werd dan ook vooreerst van het verwijderen van bios I afgezien. In dit stadium correspondeeren 3 γ inosiet met ongeveer 200 γ van het ruwe bios III. Het is m.i. niet onwaarschijnlijk, dat één der vele zuiveringstrappen, die deze laatste factor nog moet ondergaan, een scheiding van bios I en III zal teweeg brengen.

Oorspronkelijk was het mijn bedoeling bios III te isoleeren uit gist. Toen ik echter kon aantoonen, dat deze factor met een zelfde kwalitatieve werkzaamheid ook voorkomt in eieren en dat de activiteit van het drooggedampte „kool-filtraat” hierbij vijf maal zoo groot is als bij gist, leek mij eigeel als uitgangproduct verkieslijker. Dat hiervoor een bijproduct kon worden gebruikt van het op het Org. Chem. Laboratorium te Utrecht in zeer groote hoeveelheden verwerkte Chineesche eigeel, was een niet gering voordeel.

Dit laatste product werd volgens een door KÖGL en TÖNNIS uitgewerkte methode behandeld. Het fijngemalen eigeel werd met de vijfvoudige hoeveelheid koud water gedurende 10 minuten mechanisch geroerd. Na 12 uur was het eigeel voor een deel bezonken; een ander deel kwam boven drijven. De heldere vloeistof, (die geen bios bevatte), tusschen deze lagen werd zoo goed mogelijk afgeheveld. Daarna werd de koude brei gedurende 1 uur onder roeren met de vijfvoudige hoeveelheid water gekookt en vervolgens, na afkoelen tot 50° C., gefiltreerd. Het afgefiltreerde eigeel werd hierna nog eens met dezelfde hoeveelheid water gekookt en geëxtraheerd. Het gezamenlijke extract werd in vacuo bij zoo laag mogelijke temperatuur ingedampt tot $\frac{1}{30}$ van het volumen. Aan de aldus verkregen rest werd onder mechanisch roeren een gelijk volumen (gedistilleerde) aceton toegevoegd, waarbij een dik licht-geel gekleurd neerslag ontstond, dat werd afgecentrifugeerd. De vloeistof werd in vacuo ingedampt tot $\frac{1}{10}$ van

het volumen en vervolgens werd onder flink roeren een viervoudig volumen absoluten alcohol bijgedruppeld. Het neerslag werd gefiltreerd, het filtraat door gedeeltelijk indampen van alcohol bevrijd en de vloeistof, na weer te zijn teruggebracht op het oorspronkelijk volumen met zooveel lood-acetaat-oplossing behandeld, tot geen neerslag meer ontstond. Na centrifugeeren van het precipitaat werd de vloeistof geneutraliseerd met zoutzuur en het lood met H_2S verwijderd. De vloeistof werd door indampen tot $\frac{2}{3}$ van het volumen van H_2S bevrijd, vervolgens gedurende 10 à 15 minuten met kool geschud [per 45 kg eigeel \pm 500 g kool (МЕРСК)] en gefiltreerd. Het filtraat, dat nu geen bios II meer bevatte, werd in vacuo ingedampt tot een dikke, lichtbruin gekleurde, stroop.

Dit product vormde het uitgangsmateriaal voor de hierna beschreven proeven. De activiteit bleek 50 γ te bedragen.

In verband met de nauwkeurigheid van het meten, ging ik na welke invloed het uitgangsproduct uitoefende bij hogere concentraties. Vergeleken met bios III uit verse eieren bleek het materiaal in geringe mate giftig te werken. Later kon ik aantonen, dat deze giftige stof is te verwijderen door koken met verdund zwavelzuur of door behandeling met phosphorwolfraamzuur.

3. EIGENSCHAPPEN VAN BIOS III.

De werkzaamheid van bios III gaat verloren, wanneer het uitgangsmateriaal wordt verkoold; *het is dus een organische substantie.*

Eenige proeven werden genomen met het doel een indruk te krijgen van de stabiliteit van dezen factor. Daar toe werden 200 mg van het uitgangs-materiaal gedurende twee uren gekookt resp. met 50 cc. 5 % bariet-oplossing

en met 50 cc. 5 % zwavelzuur. De activiteit was door deze behandeling twee maal zoo groot geworden, terwijl de door de hogere concentraties veroorzaakte groei-toename sterker bleek te zijn dan bij het uitgangspproduct. Ik meen dit verschijnsel voorloopig te moeten verklaren door aan te nemen, dat de bovengenoemde giftige stoffen zoowel door het zuur als door het alkali in niet-giftige verbindingen zijn omgezet.

Het met zwavelzuur behandelde product werd gebruikt voor de bereiding der standaard-oplossing van bios III (zie blz. 76). Hiertoe werden 100 mg van het preparaat gebracht in 200 cc. water en deze oplossing, verdeeld over een achttal kolfjes van 25 cc., gefractionneerd gesteriliseerd bij 100°.

Een hoeveelheid onzuiver bios III werd gedurende een etmaal aan een terugvloeiakoeler gekookt met 20 % zoutzuur. De oplossing veranderde hierdoor nauwelijks van kleur en had na verwijderen van het zuur haar activiteit volkomen behouden.

Onderzocht werd verder hoe factor III reageert op zwakke oxydatiemiddelen, zooals een ammoniakale oplossing van zilver-oxyde, FEHLING's proefvocht en de oplossing van HAINES¹⁾. Mijn uitgangs-preparaat vertoonde in alle drie gevallen een zeer zwak, maar duidelijk reductie-vermogen. Na het verwijderen der reagentia bleek de werkzaamheid onveranderd te zijn.

4. POGINGEN TOT ISOLATIE VAN BIOS III.

Voor de zuivering van het ruwe bios III kwam in de

¹⁾ Zie M. KLOPSTOCK en A. KOWARSKI. Untersuchungsmethoden. 10e druk. (URBAN & SCHWARZENBERG, Berlijn 1932), blz. 175.

eerste plaats behandeling met verschillende organische oplosmiddelen in aanmerking. Ik stelde vast, dat de derde factor zich door aether, chloroform of benzol niet laat extraheeren uit een waterige oplossing. Vervolgens werd een zeker quantum van het uitgangsmateriaal opgelost in dezelfde gewichtshoeveelheid water en hierna door toevoegen van alcohol het actieve product in drie fracties gescheiden (twee als neerslag, de derde als 90 % alcoholische oplossing). Noch deze, noch een bewerking met aceton bracht eenige vooruitgang. Het resultaat van een herhaling der gefractioneerde precipitatie met alcohol-aether en met aceton-aether had evenmin succes.

Nu ik beschikte over een nauwkeurige meet-methode werd nog eens nagegaan in welke mate bios III door kool wordt geadsorbeerd. Ik kon aantonen, dat zelfs groote hoeveelheden (5 maal het gewicht van de droogrest der oplossing) hiervan geen bios III uit de oplossing verwijderen.

Vervolgens werd geprobeerd bios III te concentreeren door adsorptie aan de volgende middelen: voller's aarde, silicagel, frankoniet, frankoniet C₁, silitoniet en frankoniet S. Van de vier laatste stoffen werden ons door de N.V. Chemicaliën Im- en Export Maatschappij te Amsterdam, welwillend monsters toegezonden, waarvoor ik haar hierbij mijn oprechten dank betuig. De proeven werden als volgt uitgevoerd. Ik bracht 3 g van een bios III-preparaat, met een activiteit van 30 γ , in 50 cc. water en schudde deze oplossing gedurende een uur met 6 g van het adsorptie-middel. Daarna werd afgefiltreerd, het filtraat ingedampt en zoowel de werkzaamheid als de hoeveelheid der droogrest bepaald (in mg droogrest in 10 cc. oplossing):

contrôle	605
voller's aarde	595
silicagel	610
silitoniet	618
frankoniet	423
„ C ₁	597
„ S	579

De werkzaamheid was in elk der gevallen onveranderd gebleven en de hoeveelheid was alleen bij frankoniet verminderd. Te onderzoeken blijft dus nog of uit dit frankoniet door gefractioneerde elutie een zuiverder preparaat van bios III is te bereiden.

Een hoeveelheid oplossing van bios III werd langzaam gezogen door een kolom vast aangestampt natriumpermutiet. Deze proef had in de eerste plaats tot doel, na te gaan of bios III door permutiet wordt geadsorbeerd en in de tweede plaats na te gaan of door deze behandeling aanwezige zouten van ammoniak en aminen waren om te zetten in de overeenkomstige natrium-verbindingen, welke door precipitatie met 80 % alcohol zouden zijn te verwijderen. De proef werd uitgevoerd met 1 g bios III-preparaat (act. 30 γ) opgelost in 50 cc. water en een zuil grondig uitgewassen permutiet van 1 cm dikte en 15 cm hoogte. Na afloop werd nagewasschen met 40 cc. gedist. water. De vereenigde filtraten gaven een droogrest van 850 mg met een (onveranderde) activiteit van $\pm 30 \gamma$. Bij behandeling met 80 % alcohol sloegen slechts 50 mg van een vaste, witte stof neer. Deze methode komt dus voor een zuivering van bios III niet in aanmerking.

Vervolgens probeerde ik met een aantal reagentia of

bios III is neer te slaan in den vorm van een onoplosbare verbinding. In de eerste plaats koos ik sublimaat, 100 mg van het uitgangsmateriaal (activiteit 30 γ) werden opgelost in 2 cc. water en hieraan werd een verzadigde op-

TABEL 12.

g bios III-preparaat	cc. water	cc. abs. alcohol	cc. verz. alcohol. HgCl ₂ opl.	resultaat
2	3	10	10	actief neerslag
2	4	10	10	„ „
2	4	8	10	inactief „
2	4	5	10	„ „
1	5	20	10	geen „

lossing van sublimaat toegevoegd tot geen neerslag meer ontstond. Het precipitaat (138 mg) werd met zwavelwaterstof ontleed, waarbij een inactieve rest van 15,5 mg achterbleef. Het filtraat werd eveneens van kwik bevrijd. Bij indampen van het filtraat van het kwik-sulfide kon een product met niet noemenswaardig veranderde activiteit worden teruggewonnen.

Daarna werden nog eenige proeven genomen met oplossingen van bios III in alcohol, bij welke zich of een actief neerslag met onveranderde werkzaamheid, of een inactief precipitaat vormde (zie tabel 12).

In de tweede plaats ging ik na welke reacties een oplossing van bios III vertoonde bij toevoegen van reagentia op alkaloiden. Verdunde (10 %) oplossingen van bios III gaven hiermede geen neerslagen, behalve phosphorwolfraamzuur. Geconcentreerde (1 g uitgangsmateriaal op 1 cc. water) oplossingen gaven het volgende resultaat.

TABEL 13.

Reagens	Aard van het neerslag	Activiteit van het neerslag	Activiteit der droogrest van het filtraat
flaviaanzuur	kristallijn	inactief	30 %
pikrinezuur	"	"	" "
pikrolonzuur	"	"	" "
rufiaanzuur	"	"	" "
sozodolzuur	"	"	" "
galluszuur	geen neerslag	—	—
tannine	"	—	—
phosphorwolframzuur	" amorph	50	16 "
Reinecke zout	micro-krist.	inactief	30 "
CuSO ₄ -NaHSO ₃	geen neerslag	—	—

Alleen door de behandeling met phosphorwolframzuur is dus een zuivering van bios III te weeg gebracht.

De neerslagen met flaviaanzuur, rufiaanzuur, pikrinezuur, pikrolonzuur, sozodolzuur en Reinecke zout werden verkregen door een kleine overmaat van koud verzadigde oplossingen dezer reagentia toe te voegen aan een hoeveelheid eener oplossing van 10 g bios III-preparaat (act. 30%) in 10 cc. water. De neerslagen en de filtraten werden op de gebruikelijke wijze van de reagentia bevrijd.

Voor de precipitatie met phosphorwolframzuur werden 10 g van het uitgangsmateriaal opgelost in 10 cc. 5 % zwavelzuur. Hieraan werden toegevoegd 15 g phosphorwolframzuur eveneens opgelost in 15 cc. 5 % zwavelzuur. Direct na de toevoeging werd eenigen tijd heftig geschud. Er ontstaat een groote hoeveelheid neerslag, die werd gecentrifugeerd en gewasschen met 8 cc. sterk verdund zoutzuur. Het neerslag werd nu gesuspenderd in 200 cc. 5 % zoutzuur en in een scheidrecther drie maal geschud met een mengsel van gelijke deelen aether en amyl-alcohol. De op deze wijze van vrij phosphorwolframzuur bevrijde oplossing werd met bariet van sporen zwavelzuur ontdaan en in vacuë drooggedampt.

De rest woog 6,009 g. Het filtraat werd op dezelfde wijze van phosphorwolframzuur en zwavelzuur bevrijd en gaf een droogrest van 3,645 g. Aangezien de opbrengst van bios III bij deze behandeling 136 % zou bedragen, is het waarschijnlijk dat de zuivering gedeeltelijk berust op de verwijdering van giftige producten.

Het uitblijven van een reactie met kopersulfaat en natrium-bisulfit wijst op de aanwezigheid van slechts zeer kleine hoeveelheden adenine en urinezuur.

Uit proeven van KÖGL en TÖNNIS¹⁾ was gebleken, dat men met een zeer groote overmaat inosiet (1000 γ in plaats van 3 γ) de werking van bios III kan nabootsen. Deze waarneming doet aan de mogelijkheid denken, dat bios III een chemisch aan inosiet verwante stof is. Ik onderzocht daarom mijn uitgangsmateriaal op suiker-alcoholen en trachtte volgens MEUNIER²⁾ een benzal-verbinding te doen ontstaan. Hiertoe werd 1 g uitgangsmateriaal opgelost in 5 cc. zoutzuur (s.g. 1.19). Na filtreren van een kleine hoeveelheid onopgelost zout werd 0,5 cc. benzaldehyde toegevoegd en werd het mengsel in de ijskast bewaard. Zelfs na drie dagen had zich geen neerslag gevormd.

Het uitgangproduct gaf een sterk positieve reactie met ninhydrin. Naar aanleiding hiervan onderzocht ik of soms een der bekende aminozuren de werking van bios III vertoonde. (Zie tabel 14).

Ook werden nog gemeten adenine, asparagine, glutathion (S-S) en vitamine B₁³⁾. De eerste drie stoffen ge-

¹⁾ Z. f. Krebsforschung **40**, 203 (1934), pag. 215.

²⁾ MEUNIER. Compt. Rend. **106**, 1425 en 1732 (1888); **107**, 910 (1888); **108**, 408 (1889). Zie ook: E. FISCHER. Ber. **27**, 1535 (1894).

³⁾ Vergelijk hiermede de in Dec. 1934 verschenen publicatie van WILLIAMS en SAUNDERS [Biochem. J. **28**, 1887 (1934)], die ver-

TABEL 14.

Toegevoegd aan bios I + II	proc. Groei- toename door 10 γ	proc. Groei- toename door 100 γ
zonder toevoeging		644
0,05 cc. stand.-opl. van bios III		1040
d-alanine	712	620
dl-alanine	692	628
d-arginine	716	648
l-asparaginezuur	740	612
l-cysteine	698	684
l-cystine	692	672
d-glutaminezuur	680	690
glycocol	680	616
dl-histidine-HCl	580	628
l-leucine	716	668
d-lysine-di-HCl	712	744
d-ornithine-HCl	704	728
l-oxy-proline	724	640
dl-phenyl-alanine	676	656
dl-proline	652	628
dl-serine	664	620
l-tryptophaan	620	620
l-tyrosine	656	636
dl-valine	704	686
dl-iso-leucine	690	696

droegen zich als de aminozuren; alleen het vitamine B₁¹⁾ vertoonde een sterkere activiteit. Bij een nader onderzoek bleek, dat 0,02 γ van dit vitamine aequivalent te zijn met 30 γ van mijn uitgangspreparaat van bios III.

melden, dat Vitamine B₁ de werking van pantotheenzuur in combinatie met inosiet verhoogt.

¹⁾ Ik beschikte over een hoeveelheid pikrolonaat van vitamine B₁, dat mij welwillend was afgestaan door de I.G. Farbenindustrie A.G. te Elberfeld.

In tabel 15¹⁾ zijn voorgesteld de activiteiten van doses vitamine B₁ varierende tusschen 0,002 en 1 γ . Als uitgangsmateriaal voor deze proef werd het pikrolonaat van vitamine B₁ gebruikt. Dit werd in water opgelost en van pikrolonzuur bevrijd met een weinig, zorgvuldig uitgewasschen, ongebleekte wol²⁾. Daar het niet zeker is, dat bij deze ontleding het vitamine quantitatief werd teruggewonnen, stellen de getallen in tabel 15 minimum waarden voor.

TABEL 15.

Toegevoegd aan bios I + II	Procentueele toename
Zonder toevoeging	468
0,05 cc. stand.-opl. van bios III	652
vitamine B ₁ 0,002 γ	448
„ 0,006 „	468
„ 0,012 „	468
„ 0,016 „	580
„ 0,02 „	660
„ 0,1 „	724
„ 1 „	732

In verband met de werkzaamheid van vitamine B₁ werd onderzocht of omgekeerd het onzuivere preparaat van bios III ook anti-neuritische activiteit bezat. WINDAUS³⁾ geeft aan, dat 2,4 γ vitamine B₁, dagelijks aan een duif toegediend, deze behoedt voor polyneuritis.

1) N.B. De hierin vermelde metingen werden uitgevoerd in een periode, dat de standaard-oplossing zeer „lage” waarden gaf (1 cc. veroorzaakte (na 5 uur kweken) een groeitoename van slechts 450 %).

2) H.S. 207, 209 (1932). (H. MÜLLER).

3) H.S. 204, 123 (1932).

Daar 30 γ van mijn bios III-preparaat correspondeerden met 0,02 γ vitamine, laat zich hieruit — voor het geval, dat de activiteit van mijn bios III-preparaat op het gehalte aan anti-neuritisch vitamine berust — berekenen, dat 6 mg van het bios III-preparaat als dagelijksche dosis voor een duif voldoende moet zijn. Deze berekening is gebaseerd op de in tabel 15 vermelde metingen, welke zijn uitgevoerd met een oplossing van vitamine B₁, bereid uit het pikrolonaat, bij welke bereiding werd aangenomen, dat 100 % van het vitamine wordt teruggewonnen. De dosis van 6 mg stelt dus, evenals de getallen in tabel 15 een minimum waarde voor. De vergelijkende proef danken wij aan de I.G. Farbenindustrie A.G. te Elberfeld. Het resultaat luidde als volgt: „Die Prüfung wurde an 10 Beriberi-Tauben durchgeführt. 1 Gramm des übersandten Präparates enthält danach 80 Taubeneinheiten (kurativ), d.h. 1 Einheit ist enthalten in 12,5 Mg. Ihres Präparates. Zum Vergleich ist die getrocknete Wicküler Bierhefe heranzuziehen, die in 8 Mg. 1 Einheit enthält.“

De gevonden waarde van 12,5 mg stemt, wat orde van grootheid betreft, goed overeen met de berekende. Dit is dus een steun voor de hypothese, dat bios III en vitamine B₁ identiek zouden zijn. Tenzij men aanneemt, dat de eigenschappen van vitamine B₁ in het onzuivere bios III-preparaat geheel worden gemaskeerd, is deze veronderstelling in strijd met de waarnemingen, die aantoonen, dat bios III

1. niet wordt neergeslagen door fosforwolframaanzuur,
2. bestand is tegen koken met 5 % baricet-oplossing gedurende 2 uur,
3. en niet wordt geadsorbeerd door voller's aarde.

5. DE RESORPTIE DER BIOS-FACTOREN DOOR DE GIST.

Aan het einde dezer onderzoekingen over de bios-factoren zij nog een proef vermeld, die tot doel had te bestudeeren in hoeverre deze factoren door de groeiende gist worden opgenomen.

KÖGL en TÖNNIS vonden, dat bij gebruik van den voedingsbodem van READER door 240 γ gist gedurende een kweektijd van 5 uren uit 1 cc. standaard-oplossing, het inosiet geheel wordt verwijderd, terwijl in denzelfden tijd van het bios II hoogstens 10 % door de cellen wordt opgenomen.

Naar aanleiding van mijn onderzoek van bios III en den tot 10 uur verlengden kweektijd, leek het mij van belang de proef van KÖGL en TÖNNIS in uitgebreiden vorm te herhalen. Hiertoe werden gedurende 10 uren bij 30° C. oplossingen geschud, die resp. bestonden uit:

1° voedingsoplossing van READER	30 cc.
inosiet	150 γ
preparaat van bios II (519 b van TÖNNIS; 36.000.000 SE ₂ /g)	20 γ
water	30 cc.
gist	7 mg
2° voedingsoplossing van READER	30 cc.
inosiet	150 γ
preparaat van bios II (519 b van TÖNNIS)	20 γ
preparaat van bios III (activiteit 30 γ)	1,5 mg
water	30 cc.
gist	7 mg

Na het kweeken werden de oplossingen gefiltreerd en van ieder de ééne helft met 1 g kool geschud (ter contróle van eventueel gevormde giftige stoffen) en de andere helft direct verwerkt. Op deze wijze werden dus vier filtraten verkregen, ieder met een volumen van 30 cc. Deze vier oplossingen werden in drie porties van 10 cc. verdeeld, waaraan resp. werd toegevoegd:

25 γ inosiet + 3,5 γ bios II (prep. 519 b)

25 γ inosiet + 0,5 mg bios III (prep. act. 30 γ)

25 γ inosiet + 0,5 mg bios III (prep. act. 30 γ) +

3,5 γ bios II (prep. 519 b)

waarna het volumen van ieder mengsel werd teruggebracht op 10 cc. De door deze oplossingen veroorzaakte toenames van den groei zijn weergegeven in tabel 22, waarin, ter vergelijking van de opgenomen quantiteiten bios II en III, twee reeksen metingen zijn opgenomen, één met constante hoeveelheden bios I + III en wisselende concentraties bios II, een andere met constante hoeveelheden bios I + II en wisselende concentraties bios III. Hieruit blijkt, dat onder de gegeven omstandigheden

- 1) de factoren I, II en III vrijwel geheel worden opgenomen door de zich vormende cellen,
- 2) de opname van de factoren I en II onafhankelijk is van de aanwezigheid van bios III.
- 3) de gist, zoowel op een voedingsoplossing met bios I en II als met bios I, II en III, een weinig giftige stof produceert, die door adsorptie met kool is te verwijderen.
- 4) de aanwezigheid van 0,5 cc. voedingsoplossing van READER in de te meten oplossingen geen invloed kan hebben uitgeoefend op de resultaten.

TABEL 16.

gist gekweekt op:	koolbe- handeling	toegevoegd	proc. toename
I + II	zonder	II + III	155
”	”	I + II	625
”	”	I + III	405
”	”	I + II + III	830
”	met	II + III	186
”	”	I + II	655
”	”	I + III	235
”	”	I + II + III	1085
I + II + III	zonder	II + III	160
”	”	I + II	615
”	”	I + III	365
”	”	I + II + III	790
”	met	II + III	195
”	”	I + II	680
”	”	I + III	125
”	”	I + II + III	1110
oorspr.opl. van I + II	—	—	615
” ”	—	opl. v. READER	645
” I + II + III	—	—	1110
inosiet 5 γ +bios III	50 γ +bios II (519b)	0,35 γ	1075
” ” + ”	” + ”	0,28,,	990
” ” + ”	” + ”	0,21,,	895
” ” + ”	” + ”	0,14,,	805
” ” + ”	” + ”	0,07,,	520
inosiet 5 γ +bios II (519b)	0,35 γ +bios III (act. 30 γ)	50 γ	1110
” ” + ”	” + ”	40,,	1015
” ” + ”	” + ”	30,,	965
” ” + ”	” + ”	30,,	850
” ” + ”	” + ”	10,,	540

D. VERGELIJKING VAN DE BIOS-FACTOREN UIT EIGEEL EN URINE MET DIE UIT GIST.

Op blz. 72 werd reeds de aandacht gevestigd op het feit, dat bios II uit eigeel, in combinatie met bios III en inosiet een veel kleinere groeitoename veroorzaakt, dan bios II uit gist, onder dezelfde omstandigheden gemeten.

Deze waarneming was aanleiding tot een nauwkeuriger bestudeering van de bios-factoren uit eieren. Een extract van verse eidooiers werd daartoe op de vroeger beschreven wijze verwerkt en gescheiden in fracties met bios I, II en III. Het bios I-gehalte werd bepaald volgens de methode beschreven in hoofdstuk II sub B. Het eigeel bleek per gram 0,1 mg inosiet te bevatten. In hoofdstuk IV werd onder C reeds vermeld, dat bios III-preparaten uit eieren kwalitatief dezelfde werking vertoonen als overeenkomstige preparaten uit gist. Bios II is dus blijkbaar de eenige factor uit het eigelextract, die in zijn gedrag afwijkt van den corresponderenden factor uit gist.

Om na te gaan of het kleinere groeieffect veroorzaakt door bios II uit eigeel eventueel is toe te schrijven aan een bijgemengde giftige substantie, werd een hoeveelheid van dezen factor toegevoegd aan de standaardoplossing en gecontroleerd of de standaard-curve hierdoor werd „verlaagd”. Aangezien in tegendeel een kleine verhooging optrad, was er geen reden om aan te nemen, dat stoffen aanwezig waren, die remmend werken op de groeisnelheid van gist.

Het grootere groeieffect veroorzaakt door de factoren uit gist laat zich dan nog slechts verklaren door

- 1) aan te nemen, dat bios II uit *eigeel* niet identiek is met bios II uit *gist*,
- 2) de aanwezigheid van een vierden factor in de bios II-fractie uit *gist*,
- 3) de aanwezigheid van één of meer specifieke voedingsstoffen in de bios II-fractie uit *gist*.

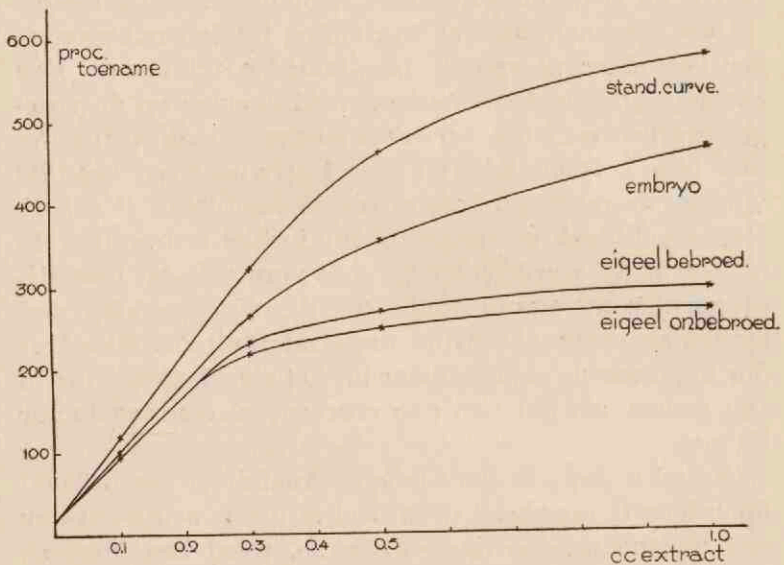


Fig. 6. Vergelijking der groeikrommen verkregen door meten der extracten van onbebroed *eigeel*, bebroed *eigeel* en een kippen-embryo (leeftijd 7 dagen) met de standaard curve.

Dit werd tot nu toe niet verder onderzocht.

Zoals te verwachten was, vertoonde bios II uit *eiwit* dezelfde eigenschappen als bios II uit *eigeel*.

Naar aanleiding van deze proeven leek het mij inte-

ressant ook den aard van de bios-factoren uit een kippenembryo na te gaan. Daartoe werden een serie bevruchte eieren eerst in onbebroeden toestand, vervolgens na 7 dagen broeden onderzocht. Uit het resultaat, dat is weergegeven in fig. 6 blijkt, dat gedurende dit proces een omzetting heeft plaats gehad, die maakt dat de groeicurve wordt „verhoogd”.

In aansluiting met de mogelijke verklaringen van het verschil in groeitoename veroorzaakt door bios uit eigeel en bios uit gist, is dit verschijnsel te verklaren door aan te nemen, dat gedurende het broeden

- 1) een omzetting heeft plaats gehad in het bios II-molecuul,
- 2) een vierde factor is gevormd,
- 3) één of meer niet specifieke voedingsstoffen zijn ontstaan.

Aangezien bij den groei van het embryo de omzetting van eiwitstoffen een belangrijke rol speelt, ging ik na of bij de proteolytische ontleding van kippeneiwit dergelijke veranderingen der bios-factoren waren te constateren als hierboven beschreven. Hiertoe bepaalde ik de groeicurven van oplossingen van kippeneiwit, die in fleschjes gedurende $\frac{1}{2}$, 3 en 6 uur met een kleine hoeveelheid pepsine werden geschud bij een temperatuur van 37° C. Bij deze proeven werd zooveel mogelijk steriel gewerkt, om een bios-vorming door eventuele bacteriën te voorkomen. De in fig. 7 (blz. 96) voorgestelde resultaten konden twee maal worden gereproduceerd. Inderdaad blijkt bij deze reactie een stof te ontstaan, die de curve „verhoogt”.

Bij de bepaling van bios in urine werd hetzelfde ver-

schijnsel waargenomen als bij bios uit eigeel. 1 cc. van een met water tot standaardconcentratie verdunde urine geeft na 5 uur kweken een groeitoename van hoogstens 350 %. Het feit, dat de curve in sommige gevallen *daalt*, nadat een maximum is overschreden, wijst er op, dat in

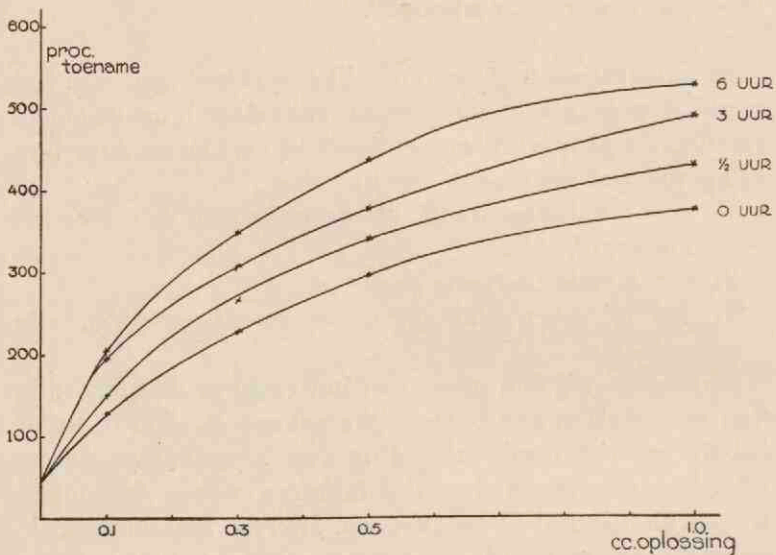


Fig. 7. Vergelijking der groeikrommen verkregen door meten van eiwitoplossingen, die door pepsine in verschillende mate waren gesplitst.

urine stoffen voorkomen, die remmend werken op de ontwikkeling der gist. Dat dit inderdaad het geval is, werd aangetoond door de verlaging van de standaardcurve, die optreedt wanneer men de groeitoename meet, veroorzaakt door een standaard-oplossing, waaraan een zekere hoeveelheid urine is toegevoegd (zie meting 7).

De bios-factoren uit urine werden eveneens nader onderzocht. Het resultaat is weergegeven in de volgende metingen.

Meting 7:	Proc. toename
Stand.opl.	676
„ + urine	572
„ + „alcoh. filtr.” (I + II + III) uit urine	536
„ + „lood-filtr.” (II + III)	572
„ + „lood-neerslag” (I)	732
„ + bios II	672
„ + bios III	680
bios II (uit urine)	196
bios II „ „ + inosiet	296
bios II „ „ + inosiet + bios III	322
bios II (uit gist) + bios I en III	668

Hieruit blijkt dat,

- 1) bij scheiding der factoren de giftige stoffen worden meegevoerd in de fractie van bios II en III,
- 2) na de scheiding van de factoren II en III de giftige stoffen achterblijven in de kool,
- 3) na verwijdering van de giftige stoffen, de factoren uit urine hetzelfde gedrag vertoonen als die uit eieren.

De verklaring van de kleinere groeitoename veroorzaakt door urine is dus dezelfde als bij het extract van eigeel.

Tegenover extracten uit een aantal dierlijke organen, die een „normale” groeikromme veroorzaken, staan extracten, die evenals bios-preparaten uit eieren en urine, een „verlaagde” groeikromme vertoonen. In de laatste gevallen zou men dus kunnen concludeeren, dat of bios II, of een eventuele vierde factor, of onspecifieke voedings-

stoffen in het dierlijk organisme een verandering kunnen ondergaan (b.v. door oxydatie of door reductie).

E. BEPALING VAN HET BIOS-GEHALTE IN STOFFEN VAN DIERLIJKE EN VAN PLANTAARDIGE OORSPRONG.

Ten behoeve van de onderzoeken ter isolatie van biotine, hield ik mij bovendien nog bezig met de bepalingen van het bios-gehalte in stoffen van dierlijken¹⁾ en van plantaardigen oorsprong ten einde een product te vinden, dat door zijn hoog bios-gehalte een geschikt uitgangsmateriaal zou vormen. Natuurlijk is hiermede dit doel slechts ten deele bereikt. Het antwoord op de vraag of een stof geschikt is als uitgangsmateriaal voor de isolatie van bios II kan pas worden gegeven bij het verwerken der extracten. Het criterium voor de geschiktheid is n.l. niet alleen een hoog bios-gehalte, doch tevens de mogelijkheid van een gemakkelijke verwijdering der begeleidende inactieve stoffen.

Dergelijke bepalingen konden tevens van belang zijn om iets te weten te komen over een functie, die bios in het dierlijk organisme te vervullen heeft.

Het bios-gehalte werd zooals gewoonlijk gemeten door de groei-toename van gist te bepalen, welke veroorzaakt wordt door de extracten van bovengenoemde stoffen. Hierbij is verondersteld, dat deze groei-toename teweeg gebracht werd door eenzelfde complex van groeistoffen.

Door onderzoeken van EASTCOTT, WILLIAMS, e.a. was reeds bekend geworden, dat stoffen, die de voortplan-

¹⁾ DR. H. J. M. HOOGLAND was zoo vriendelijk de benodigde organen te prepareren.

tingsnelheid van gist verhoogen, in het planten- en dierenrijk zeer algemeen voorkomen. De meeste dezer onderzoekingen waren meer kwalitatief dan quantitatief.

De in de volgende tabellen vermelde waarden zijn verhoudingsgetallen, die alleen betrekking hebben op het gebruik van „Heferasse M”, gekweekt onder de voorwaarden beschreven in hoofdstuk II. Daar het mogelijk is, dat het gebruik van een ander gistras verschillende verhoudingen van het bios-gehalte met zich mede zou brengen, zijn de vermelde cijfers dus niet van absolute waarde. Voor het verrichten van deze bepalingen werd het te onderzoeken materiaal zoo goed mogelijk fijn verdeeld en vervolgens geëxtraheerd door met 5 cc. water per gram vaste stof gedurende 30 min. in kokend water te verhitten in een met een wattenprop gesloten kolfje. Het extract werd daarna gefiltreerd door een z.g. membraanfilter.

Aangezien tijdens het uitvoeren van deze bepalingen nog niets bekend was over de moleculairgewichten der biosfactoren, werd nagegaan, of de poriën-wijdte van deze filters ook eenigen invloed had op het bios-gehalte. Hiertoe mat ik een aantal filtraten, verkregen door eenzelfde extract te filtreren door filters van zeer uiteenlopende doorlaatbaarheid. Het bios-gehalte van alle filtraten was gelijk aan dat van het niet gefiltreerde extract.

De gefiltreerde oplossingen werden, na eenige voorloopige metingen, zoodanig verdund, dat 0,1 cc. van het verdunde extract een groeitoename van omstreeks 120 % gaf ¹⁾. Het daarna nauwkeurig bepaalde bios-gehalte is

¹⁾ Zie de bespreking op blz. 36.

in de volgende tabellen steeds aangegeven in S.E. per gram.

Terwille van de vergelijkbaarheid zijn de metingen in stoffen van dierlijken oorsprong, indien eenigszins mogelijk, uitgevoerd met organen afkomstig van eenzelfde specimen.

Ten einde na te gaan of de verschillen in bios-gehalte worden veroorzaakt door een wisselend watergehalte dezer organen, werd dit in enkele gevallen bepaald.

gr. hersenen	74 %
hypophyse	72 %
pancreas	75 %
melkklier	60 %
speekselklier	73 %
kauwspier	73 %

Uit deze getallen, die betrekking hebben op tabel 18 (blz. 103), blijkt, dat het watergehalte slechts weinig varieert.

Over de vraag, of bios in het dierlijk organisme een functie te vervullen heeft, zijn aan de hand der uitgevoerde bepalingen nog geen conclusies te trekken, ofschoon de volgende feiten opmerkelijk zijn.

Bij den hond (tabel 17, blz. 102) is praktisch in alle organen bios aan te toonen. Nergens vindt men echter een concentratie, die van het algemeene tamelijk lage „bios-niveau” afwijkt.

Bij de koe (tabel 18, blz. 103) treedt eveneens een „bios-niveau” op, maar het is opvallend, dat bij specimen B,

waar in het bijzonder ook het bios-gehalte van het maagdarmkanaal (en ook zijn inhoud) nauwkeurig werd onderzocht, een toename van dit gehalte van slokdarm tot ileum optreedt. Mogelijk houdt dit verband met een bios produceerende darm-flora. Bij specimen C is het bios-gehalte van het darmkanaal niet verhoogd; dit kan samenhangen met het feit, dat het hier een kalf betreft, hetwelk alleen moedermelk gedronken heeft.

Bij de kip (tabel 20, blz. 105) blijken zoowel de nieren, de lever en het eigeel een uitzonderlijk hoog bios-gehalte te bezitten. Opvallend is het verschil in bios-gehalte der eifollikels. Dit gehalte stijgt naarmate de follikel ouder wordt. Om zeker te zijn, dat dit verschijnsel niet wordt veroorzaakt door een verschil in het watergehalte, werd dit laatste bepaald in de follikels van 2,2, 5,4, 12,0 en 18,1 g. Het bleek resp. te bedragen 46,2, 46,3, 45,9 en 46,6 %.

Het „bios-niveau” in de organen van de kip is hoger dan in de organen van de andere onderzochte dieren, hetgeen wellicht samenhangt met het voedsel.

TABEL 17.

BIOS-GEHALTE IN ORGANEN VAN HONDEN.

- A. vrouwelijk exemplaar; oud 2 à 3 jaar; geen afwijkingen; gewicht 9 kg.
 B. mannelijk exemplaar; oud 10 à 12 mnd.; geen afwijkingen; gewicht 11,5 kg.

Orgaan	bios gehalte per g. versch weefsel		Orgaan	bios gehalte per g. versch weefsel	
	A	B		A	B
slokdarm	54		testikels		109
maag-fundus	148	204	epididimis		212
epitheel				corpus cavernosum	
maag-fundus	129	47	prostaat		76
spierweefsel				ovarium	60
maag pylorus	132	65	uterus	91	
epitheel				groote hersenen	200
maag pylorus	113	49	kleine "	187	169
spierweefsel				halsmerg	
duodenum	132	65	verlengde merg		148
ileum	113	49	borstmerg	134	150
jejunum		54	lendemerg		145
colon	128	84	beenspier		46
rectum epitheel		84	rugstrekker	79	46
" spierweefsel		88	biceps brachys		68
lever	113	133	musc. semi-		
gal (S.E. per cc.)		71	membranosis	63	
pancreas	195	160	hartspier	98	78
milt	121	121	aorta (borst)	103	
schildklier	140	108	bloedplasma	28	
hypofyse	270		erythrocyten	40	
lymphklier			gehomog. bloed	59	
(mesenteriaal)	83		long	124	62
parotis		237	huid	78	50
nier schors	113	103	vetweefsel omentum	61	
" merg	82	72	" subcutaan	41	
blaas	102	84			

TABEL 18.

BIOS-GEHALTE IN ORGANEN VAN RUNDEREN.

- Onderzocht werden de organen van
 A. een koe met een ouderdom van ± 9 jaar.
 B. „ „ „ „ „ „ ± 7 „
 C. „ stierkalf „ „ „ „ 4 dagen.
 D. verschillende individuen met onbekenden leeftijd.

Orgaan	Bios-gehalte per g versch weefsel			
	A	B	C	D
inhoud pens		420		
„ netmaag		414		
„ lebmaag		346	300	
„ boekmaag		576		
„ duodenum		424		
„ ileum		1259	156	
„ colon		1187	156	
„ appendix			142	
„ rectum		1229		
slokdarm	81	144		135
pens		223		
boekmaag wand		227		
„ „bladen”		243		
lebmaag spierweefsel	90	167		110
„ epitheel	166	274	185	160
netmaag		174		
duodenum	233	330		230
ileum		860	126	
jejunum	275			
colon		603	96	265
rectum epitheel	450	382	109	
„ spierweefsel	160	148		
appendix			97	
huid		94	197	
vetweefsel	59	55		
grote hersenen	123	200	310	160
kleine „	128	146	366	170
ruggemerg	71	110	264	125

Vervolg van tabel 18.

Orgaan	Bios-gehalte per gr. versch weefsel			
	A	B	C	D
hypofyse	192	223	217	180
schildklier	129	109	246	
thymus			107	120
bijnier	270	285	225	170
lever	150	158	189	
pancreas	218	212	194	140
milt	149	160	229	
nier merg	337	329	316	
„ schors		224		
melklier		138		150
ovarium	81	63		110
corpus luteum	181	197		200
follikel-vocht (S.E. per cc.)	60	63		80
testikels			200	
penis			90	
spier middenrif		55	146	
uitwendige kauwspier			100	75
inwendige	99	80		
pees achterpoot	43	43		
spier voorpoot			56	
long	98	151	178	
oogspier		76		
sklera		72		
glasachtig lichaam		0		
kristallens		30		
netvlies		170		
nier	108			
spier achterpoot		68		
speekselklier				100
beenmerg				40

TABEL 19.

BIOS-GEHALTE IN EENIGE ORGANEN VAN HET VARKEN.
(afkomstig van verschillende specimen van
onbekenden leeftijd).

orgaan	bios-gehalte per g versch weefsel	orgaan	bios-gehalte per g versch weefsel
ruggemerg	140	milt	80
slokdarm	130	bijnier	150
maag	110	nekspier	160
ileum	140	bilspier	86
pancreas	90		

TABEL 20.

BIOS-GEHALTE IN EENIGE ORGANEN DER KIP.
Ouderdom \pm 1 jaar; geen afwijkingen.

orgaan	bios-gehalte per g. versch weefsel	orgaan	bios-gehalte per g. versch weefsel
Krop	138	borstspier	48
kliermaag	321	beenspier	73
spermaag spierweefsel	241	vetweefsel (omentum)	58
„ bindweefsel	79	wand oviduct 1 (bij cloaco)	215
„ epitheel	462	„ „ 2	155
middendarm	776	„ „ 3	166
einddarm	281	„ „ 4	200
appencix	828	„ „ 5	207
lever	1652	„ „ 6 (bij	
gal (S.E. per cc.)	489	ovarium)	214
milt	707	ovarium	465
pancreas	874	kleinste eifollikels (+ vlies)	355
nier	2563	eifollikel (+ vlies) 0,7 g	439
hersenen	186	„ (inhoud) 2,2 g	807
long	150	„ „ 5,4 g	1021
hartspier	235	„ „ 12,0 g	1197
kam	136	„ „ 18,1 g	1562

TABEL 21.

BIOS-GEHALTE VAN EENIGE ZADEN (IN S.E. PER G AAN DE LUCHT
GEDROOGDE STOF).

peulen	900	pluksla	1813
snijbiet	378	kropsla	2760
zeekool	708	snijsla	3450
witte kool	1065	veldsla	657
roode kool	650	cichorij	1017
spruit kool	1400	postelein	545
bloemkool	1640	komkommer	863
savoye kool	972	schorseneeren	1995
boeren kool	1280	asperge	530
pronkboonen	695	zuring	595
stam snijboonen	530	capucijners	975
tuinboonen	760	kervel	785
stok slaboonen	760	rapen	1890
stok snijboonen	1040	wortelen	2190
doperwten	1730	uien	1480
tomaten	2018	radijs	1978
peterselie	4903	koolraap	1270
tuinkers	5150	bieten	605
augurken	864	andijvie	2864
rabarber	2330	prei	2213
anijs	2655	raapstelen	2175
spinazie	820	ramenas	1860
maïs	600		

TABEL 22.

BIOS-GEHALTE IN DIVERSE PRODUCTEN.

pepsine	70
trypsine	1200
pepton (Witte)	400
fibrine	80
gelatine	160
caseïne	25
kippen-ei (geheel)	400
duiven-ei	760
kieviets-ei	1250
urine (mensch) in S.E. per cc.	200
„ (paard) „ „ „ „	290
„ (koe) „ „ „ „	320

SAMENVATTING.

- 1) Voor de bestudeering van het bios-vraagstuk werd nagegaan welke stoffen voor den groei van een „Brennerei-Oberhefe” (Rasse M van het Institut für Gärungsgewerbe te Berlijn) noodzakelijk zijn. Deze gistsoort ontwikkelt zich in een voedingsbodem bestaande uit een oplossing van glucose en eenige anorganische zouten slechts zeer langzaam. Voor een normalen groei zijn behalve het biotine van KÖGL en TÖNNIS nog minstens twee andere groeistoffen noodig, welke hier bios I en bios III werden genoemd.
- 2) De beide laatstgenoemde bios-factoren onderscheiden zich door de volgende eigenschappen. Bios I wordt neergeslagen door loodacetaat en ammonia en gedraagt zich dus als het bios I van LUCAS, dat door EASTCOTT uit theestof werd geïsoleerd en kon worden geïdentificeerd als meso-inosiet. Bios III blijft achter in de oplossing, waaruit het biotine met kool, en het bios I met loodacetaat en ammonia zijn verwijderd.
- 3) Een methode werd uitgewerkt ter quantitative bepaling van bios I en deze stof op een dusdanige manier uit gist geïsoleerd, dat in tegenstelling met de werkwijze van EASTCOTT de mogelijkheid van secundaire veranderingen van de oorspronkelijke actieve verbinding vrijwel geheel werden uitgesloten. Ook bios I uit gist bleek identiek te zijn met meso-inosiet.

- 4) Andere meerwaardige alcoholen, waaronder de stereo-isomeren scylliet en l-inosiet, waren niet in staat meso-inosiet te vervangen. De activiteit van meso-inosiet houdt dus op zeer specifieke wijze verband met zijn constitutie.
- 5) Er wordt een methode aangegeven voor het meten van bios III.
- 6) Bios III blijkt een organische stof te zijn, bestand tegen verhitting met 20 % zoutzuur en een 5 % oplossing van bariet. Het verandert niet door oxydatie met een ammoniakale oplossing van zilveroxyde. Uit het zuiverste door mij verkregen preparaat van bios III laat zich de actieve stof noch door phosphorwolfruur, noch door andere reagentia op alkaloiden neerslaan. Bios III wordt gedeeltelijk door „Frankoniet” geadsorbeerd.
- 7) De bekende aminozuren zijn niet in staat de werking van bios III te imiteeren, daarentegen blijkt vitamine B₁ den derden factor geheel te kunnen vervangen.
Uit de vrij goede overeenstemming tusschen de berekende en de gemeten antineuritische werkzaamheid van het onzuivere preparaat van bios III zou men kunnen besluiten tot de identiteit van den derden factor en vitamine B₁. Het chemische gedrag van genoemden factor is hiermede echter in strijd, tenzij men aanneemt, dat de eigenschappen van vitamine B₁ in het onzuivere preparaat van bios III geheel worden gemaskeerd.
- 8) Gedurende den groei worden zoowel bios I, bios III als biotine vrijwel quantitatief door de gist opgenomen.

- 9) Een vergelijking van de werkzaamheid der bios-factoren uit eigeel en urine met die uit gist leidde tot de veronderstelling, dat in de bios II-fractie uit gist nog een vierde factor of één of meer niet specifieke voedingsstoffen aanwezig moeten zijn. Tevens bestaat echter de mogelijkheid, dat biotine uit gist niet identiek is met biotine uit dierlijk materiaal.
- 10) Het bios-gehalte van dierlijke weefsels werd bepaald door oriënteerende proeven, die echter nog geen licht werpen op een eventueele functie van bios in het dierlijk organisme.

ZUSAMMENFASSUNG.

- 1) Im Zusammenhang mit Studien über das Biosproblem wurde untersucht, welche Stoffe für das Wachstum einer Brennerei Oberhefe (Rasse M vom Institut für Gärungsgewerbe, Berlin) notwendig sind.

Die genannte Heferasse entwickelt sich auf einem Nährboden, der Glucose und einige anorganische Salze enthält, nur sehr langsam. Für ihr normales Wachstum sind ausser dem Biotin von KÖGL und TÖNNIS noch mindestens zwei andere Wuchsstoffe nötig, die als Bios I und Bios III bezeichnet wurden.

- 2) Die beiden letzteren Biosfaktoren unterscheiden sich in folgenden Eigenschaften.

Bios I wird durch Bleiacetat und Ammoniak gefällt; es verhält sich also wie das Bios I von LUCAS, das von EASTCOTT aus Theestaub isoliert und als Meso-Inosit identifiziert werden konnte.

Bios III bleibt in den Extrakten, aus denen Biotin mit Kohle und Bios I mit Bleiacetat und Ammoniak entfernt worden sind, in Lösung zurück.

- 3) Es wurde eine Methode für die quantitative Bestimmung von Bios I ausgearbeitet und diese Verbindung aus Hefe isoliert. Die Aufarbeitungs-Methode wurde im Gegensatz zu EASTCOTT so gewählt, dass die Möglichkeit sekundärer Veränderungen der ursprünglichen aktiven Verbindung so gut wie ausgeschlossen wurde. Auch das aus Hefe isolierte Bios I erwies sich als identisch mit Meso-Inosit.

- 4) Andere mehrwertige Alkohole, so auch die Stereo-isomeren Scyllit und l-Inositol waren nicht imstande den Meso-Inositol zu ersetzen. Die Aktivität des Meso-Inositols ist also konstitutionsspezifisch.
- 5) Es wird eine Messmethode für Bios III angegeben.
- 6) Bios III ist eine organische Verbindung, die gegen Kochen mit 20 %iger Salzsäure und 5 %iger Barytlauge beständig ist. Sie wird durch Oxydation mit ammoniakalischer Silberoxydlösung nicht verändert. Aus meinem reinsten Präparat von Bios III lässt sich die aktive Verbindung weder durch Phosphorwolframsäure noch durch andere Alkaloidreagenzien fällen. Bios III wird teilweise an Frankonit adsorbiert.
- 7) Die bekannten Aminosäuren zeigen keine Bios III-Wirkung, dagegen scheint Vitamin B₁ den dritten Faktor vollkommen ersetzen zu können. Aus der ziemlich guten Übereinstimmung zwischen der berechneten und gefundenen antineuritischen Wirksamkeit des rohen Bios III-Präparates könnte man auf die Identität des dritten Faktors mit Vitamin B₁ schließen. Hiermit steht jedoch das chemische Verhalten des dritten Faktors in Widerspruch, wenn man nicht annehmen will, dass die Eigenschaften des Vitamin B₁ im rohen Bios III-Präparat völlig überdeckt werden.
- 8) Während des Wachstums werden sowohl Bios I, Bios III als auch Biotin beinahe quantitativ von der Hefe aufgenommen.
- 9) Ein Vergleich der Wirksamkeit der Biosfaktoren aus Eigelb und Harn mit denen aus Hefe führte zu der Annahme, dass in der Bios II-fraktion aus Hefe noch

ein vierter Faktor oder ein oder mehrere unspezifische Nahrungsstoffe vorhanden sein müssen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass Biotin aus Hefe nicht mit Biotin aus tierischem Material identisch ist.

- 10) In orientierenden Versuchen wurde der Bios-Gehalt tierischer Gewebe bestimmt; es ergab sich noch kein Hinweis auf eine etwaige Funktion der Bios-Faktoren im tierischen Organismus.

SUMMARY.

- 1) In studying the bios-problem we have tried to ascertain which substances are necessary for the growth of a „Brennerei Oberhefe“ (Rasse M from the Institut für Gärungsgewerbe, Berlin). In a solution of glucose and some inorganic salts this yeast-race develops very slowly. Besides the biotin of KÖGL and TÖNNIS at least two more growth-substances, which in this thesis are called bios I and bios III, are needed for normal growth.
- 2) These latter factors are distinguished by the following properties.
Bios I is precipitated by lead-acetate and ammonia and thus behaves like LUCAS' bios I, which was isolated from teadust by Eastcott and identified as meso-inositol.
Bios III remains in the solution from which biotin and bios I have been removed respectively by charcoal and by lead-acetate and ammonia.
- 3) After having worked out a method for the quantitative determination of bios I, the latter was isolated from yeast. This method, contrary to EASTCOTT'S procedure, practically precludes the possibility of secondary transformations of the original active substance. Bios I from yeast also proved to be identical with meso-inositol.
- 4) Other polyalcohols, among which were scyllitol and l-inositol, were not able to replace meso-inositol. The activity of the latter thus is very specifically connected with its constitution.

- 5) A method is given for the determination of bios III.
- 6) Bios III proved to be an organic substance, which is not altered by heating with 20 % hydrochloric acid and a 5 % solution of baryta. It will not change by oxydation with an ammoniacal solution of silveroxyde. At the degree of purity reached up to now bios III is neither precipitated by phosphotungstic acid nor by other reagents on alcaloids. It is partially adsorbed by „franconite”.
- 7) The common amino-acids cannot imitate the effect of bios III, but then it was proved that this factor can be completely replaced by vitamin B₁.
The calculated and the estimated antineuritic activity of the crude preparation of bios III agree to an extent as would justify the identity of vitamin B₁ and the third factor. The chemical behaviour of the latter, however, contradicts this assumption unless the properties of vitamin B₁ are fully masked in the crude preparation of bios III.
- 8) During growth bios I, bios III as well as biotin are almost quantitatively taken up by the yeast.
- 8) During growth bios I, bios III as well as biotin are in yeast and urine with those from yeast lead to the supposition that either a fourth factor or one or more non-specific foodstuffs must be present in the bios II-fraction from yeast. At the same time there is a possibility of biotin from yeast being not identical with biotin from animal sources.
- 10) The bios-content of animal tissues was determined by preliminary experiments which, however, do not yet throw light on a possible function of bios in the animal organism.

INHOUD.

Blz.

Inleiding	1
HOOFDSTUK I.	
HISTORISCH OVERZICHT VAN HET BIOS- VRAAGSTUK	1
A. Van de polemieek tusschen PASTEUR en LIEBIG tot de ontdekking der vitaminen	2
B. Van de ontdekking der vitaminen tot heden	9
Literatuur-register	21
HOOFDSTUK II.	
DE MEETMETHODE	25
A. Inleiding	25
B. De gist	31
C. De voedingsoplossing	32
D. De verdunningen en de standaardoplossing	33
E. De nephelometer	37
F. De berekening	37
G. Ervaringen met de meetmethode	40
HOOFDSTUK III.	
EIGEN ONDERZOEK	44
A. Over het aantal bios-factoren van „Hefe- rasse M”	46
B. Het isoleeren van bios I uit gist	50
C. Onderzoek van bios III	64
1. Het meten van bios III	66
2. Het uitgangsmateriaal	78
3. Eigenschappen van bios III	80
4. Pogingen tot isolatie van bios III	81

	Blz.
5. De resorptie der bios-factoren door gist .	90
D. Vergelijking van de biosfactoren uit eigeel en urine met die uit gist	93
E. Bepalingen van het bios-gehalte in stoffen van dierlijken en plantaardigen oorsprong .	98
Samenvatting	107
Zusammenfassung	110
Summary	113

STELLINGEN.

I.

De argumenten van Winter voor het bestaan van vrij, gebonden en nieuw gevormd inosiet in de hartspeer van den hond zijn weinig overtuigend.

Biochem. J. 28, 6 (1934)

II.

De door Wrede opgestelde formule voor het prodigiosine is aan bedenkingen onderhevig.

H.S. 215, 67 (1933)

„ 219, 267 „

„ 222, 203 (1934)

„ 226, 95 „

III.

Het vraagstuk van het haematoprosthetine kan noch door de onderzoekingen van Herzog, noch door de hiertegen aangevoerde argumenten van Fischer en Zeile als opgelost worden beschouwd.

Biochem. Z. 264, 412 (1933)

„ „ 272, 13 (1934)

H.S. 222, 151 (1933)

IV.

De conclusie van Aoyama en Monna, dat Bismuth niet allotroop is, berust op zwakke gronden.

Sci. Rep. of the Toh. Imp. Univ. 23, 52 (1934)

V.

De bewering van M m e D o b r y, dat de solvatatie als verklaring van de relatieve viscositeits-verhooging van colloïde oplossingen onaanvaardbaar zou zijn, moge in sommige gevallen juist wezen, doch zij houdt niet rekening met het gedrag van vele colloïde oplossingen in water.

J. Chim. Phys. 31, 568 (1934)

VI.

Ook door nieuwere onderzoekingen wordt de opvatting van d' H é r e l l e omtrent de natuur van den bacteriophage gesteund.

VII.

Vele extracten van *Secale cornutum* zijn niet voldoende betrouwbaar. Het ware te wenschen, dat men evenals bij digitalisbladen, kon beschikken over houdbare en door een centraal instituut physiologisch geijkte preparaten.

