



# Over hetero-auxine

<https://hdl.handle.net/1874/321346>

Ag. 192, 1935

# OVER HETERO-AUXINE

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.

D. KOSTERMANS









OVER HETERO-AUXINE

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



1778 3717

*Diss. Utrecht 1935*

# OVER HETERO-AUXINE

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD  
VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE  
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT  
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS  
DR. H. BOLKESTEIN, HOOGLEERAAR IN DE  
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE,  
VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAT DER  
UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE BE-  
DENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN  
NATUURKUNDE OP DINSDAG 18 JUNI 1935, DES  
NAMIDDAGS TE DRIE UUR

DOOR

DÉSIRÉ GEORGE FLORENT RUDOLPHE KOSTERMANS  
GEBOREN TE SEMARANG

1935

DRIUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER  
RIJKSUNIVERSITEIT  
UTRECHT.





*Aan mijn Ouders.*  
*Aan Stien.*



*Bij de voltooiing van dit proefschrift breng ik mijn hartelijke dank aan de Hoogleraren en oud-Hoogleraren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde en aan Allen, die tot mijn wetenschappelijke opleiding hebben bijgedragen.*

*Dit geldt natuurlijk in het bijzonder voor U, Hooggeleerde KÖGL, Hooggeachte Promotor, voor de voortdurende belangstelling, die Gij voor mijn werk hebt gehad en voor het assistentschap, dat Gij mij hebt verleend.*

*Deze dank strekt zich verder uit tot al mijn collega's, die mij meermalen met raad en daad hebben terzijde gestaan en tot het gezamenlijk personeel van het Organisch Chemisch Laboratorium, waarvan ik steeds alle medewerking heb onderhouden.*





## THEORETISCH GEDEELTE

### EERSTE HOOFDSTUK.

## DE ISOLEERING EN HET CHEMISCH ONDERZOEK VAN DE DRIE AUXINEN

### 1. Inleiding.

Deze dissertatie werd in het Organisch Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht bewerkt en behandelt een deel van de onderzoekingen over auxinen, die aldaar zijn verricht door F. Kögl en zijn medewerkers, waartoe de schrijver zich gedurende enkele jaren heeft mogen rekenen. Door een doelmatige verdeling van het werk vulden de resultaten van de verschillende medewerkers elkaar aan, zoodat het gebied van de auxinen binnen betrekkelijk korte tijd opgehelderd kon worden. Aan de schrijver dezer dissertatie viel ten deel de isoleering van het auxine uit gist en het onderzoek naar de specifiteit van hetero-auxine. Deze beide punten hangen ten nauwste samen met de door F. Kögl, A. J. Haagen-Smit en H. Erxleben onderzochte auxine-problemen, zoodat op deze onderzoekingen en haar botanische grondslag nader ingegaan dient te worden.

Een bespreking van het oudere botanische werk over „de groeistof” kan hier achterwege blijven <sup>1)</sup>. Eerst de bekende publicatie van F. W. Went <sup>2)</sup>, waarin hij een methodiek

---

<sup>1)</sup> Voor een literatuuroverzicht van deze publicaties, zie: F. W. Went, Rec. Trav. Bot. néerl. 25, 1 (1928); vgl. ook: Lehrbuch der Pflanzenphysiologie van S. Kostytschew en F. A. F. C. Went, 2de deel, 1931 (uitgave J. Springer, Berlijn).

<sup>2)</sup> F. W. Went, Rec. Trav. Bot. néerl. 25, 1 (1928).

beschreef, waarmede een nagenoeg quantitative bepaling van het auxine mogelijk werd, gaf de beslissende stoot tot het chemisch onderzoek. Evenals bij vroegere onderzoekingen worden ook bij deze methodiek de kiemplantjes van haver gebruikt.

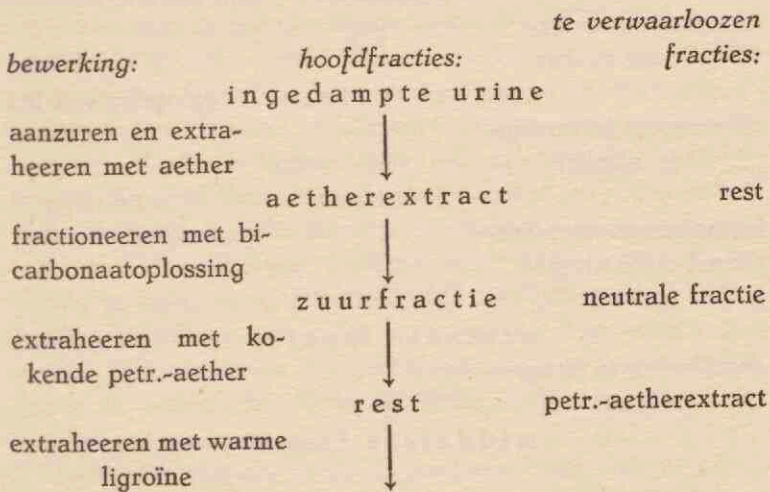
Het auxine wordt in de top van de coleoptile gevormd en gedurende de groei polair — van de top naar de basis — getransporteerd. Snijdt men nu de top af, dan vindt gedurende enkele uren geen groei meer plaats, tot langzamerhand de top zich regeneert en dus opnieuw auxine gevormd en getransporteerd kan worden. F. W. Went ontdekte nu, dat, wanneer men dergelijke afgesneden coleoptile-toppen op een dun plaatje agar plaatste, het auxine uit de toppen in de agar diffundeerde. Een blokje agar, dat op deze wijze met auxine was „geladen”, legde hij op een versch gedecapiteerde coleoptile en nam waar, dat het groeiproces verliep, alsof er geen decapitatie had plaats gehad. De plantentop kan dus vervangen worden — althans gedurende enkele uren — door een auxinehoudend agarblokje. Went paste nu de volgende kunstgreep toe: Het agarblokje werd niet centrisch op de gedecapiteerde coleoptile geplaatst, maar excentrisch. Het naar beneden getransporteerde auxine komt nu slechts in aanraking met die plantencellen, die zich onder het agarblokje bevinden. Het gevolg zal zijn, dat deze cellen zich gaan strekken, niet echter de diametraal daar tegenover liggende cellen, met als resultaat een kromming van de coleoptile van het agarblokje af. Deze kromming is binnen bepaalde grenzen en onder bepaalde omstandigheden evenredig met de auxineconcentratie in het agarblokje <sup>1)</sup>.

## 2. De isoleering van auxine-a en auxine-b.

Nu deze testmethode gegeven was, moesten geschikte uit-

<sup>1)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. 214, 247 (1933).

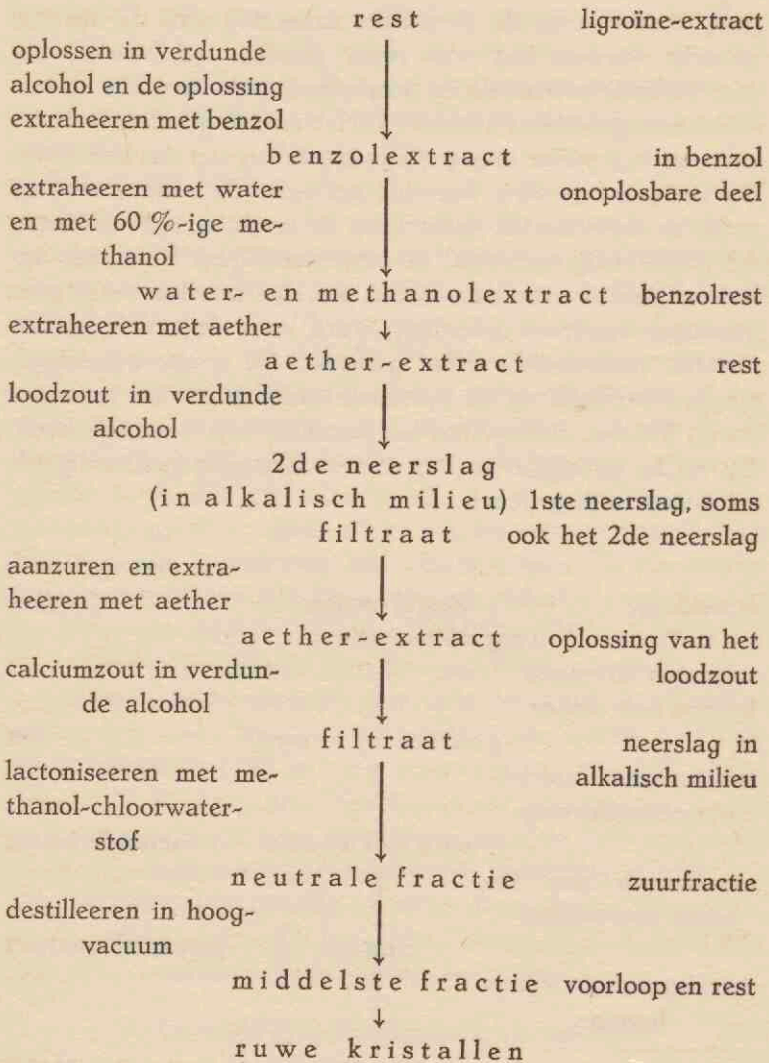
gangsstoffen voor de chemische isoleering van de auxinen gezocht worden. Het was reeds geruime tijd bekend, dat verschillende schimmels en bacteriën auxinen vormen en aan hun voedingsbodems afstaan <sup>1)</sup>). Het auxine-gehalte van deze cultures was echter zeer gering vergeleken met dat van urine. De aangewezen weg was dus om eerst de actieve stof uit urine te isoleeren en eerst later te trachten een isoleering uit plantaardig materiaal te bewerkstelligen. Daar het opwerken van de urine van dieren, b.v. van merries, zeker geen gunstiger resultaat opleverde, werd voor de isoleering uitsluitend menselijke urine gebruikt. De eerste zuiverings-trappen berusten op de oplosbaarheid van auxine in aether en op het feit, dat auxine het karakter van een zuur heeft. De verder gevolgde weg ter concentreering is in de volgende tabel kort weergegeven.



<sup>1)</sup> N. Nielsen, *Planta* 6, 376 (1928); *Jahrb. f. wiss. Bot.* 73, 189 (1930).

P. Boysen-Jensen, *Biochem. Z.* 236, 205, 239, 243 (1931) en 250, 270 (1932).





De na omkristalliseeren verkregen zuivere stof kreeg de naam auxine (van *αὐξάνω* = doen groeien); later werd voor

deze verbinding, ter onderscheiding van een nauw verwante, eveneens actieve stof, de naam auxine-a ingevoerd. De kristallen waren optisch actief, smolten bij  $190^{\circ}$  C. en hadden de brutosamenstelling  $C_{18}H_{32}O_5$ . Hun werkzaamheid bedroeg 50 milliard AE per gram.

*Onder een AE (= avena-eenheid) wordt die hoeveelheid auxine verstaan, die in een agarblokje van  $\frac{1}{600}$  cm<sup>3</sup> aanwezig moet zijn om bij de test van F. W. Went aan een gedecapiteerde coleoptile bij een vochtgehalte van 92 % en een temperatuur van  $22-23^{\circ}$  C. binnen twee uren een kromming van  $10^{\circ}$  te voorschijn te roepen.*

Naast het chemisch onderzoek van auxine-a liepen proeven, die zich bezig hielden met de vraag naar de afkomst en de beteekenis ervan. Het bleek, dat de auxine-uitscheiding het grootst was enkele uren na de hoofdmaaltijd en wel ontstonden er, indien men de per uur uitgescheiden hoeveelheid auxine — uitgedrukt in AE — afzette tegen de tijd, duidelijke maxima in de grafiek. Daar deze zgn. auxine-toppen op hongerdagen niet optraden, konden verschillende dieeten erop onderzocht worden, of zij de auxine-toppen al dan niet te voorschijn riepen. Bij deze door A. J. Haagen Smit<sup>1)</sup> uitgevoerde proeven bleek nu, dat glucose, zetmeel en kippeneiwit geen maxima deden ontstaan, doch dat deze wel optraden, indien slaolie of boter werd genuttigd. Dit resultaat gaf aanleiding tot het onderzoek van oliën en vetten op hun gehalte aan auxine. Inderdaad kon in verschillende oliën en vetten auxine, hetzij in veresterde, hetzij in vrije toestand, aangetoond worden.

Daarmede was een nieuw uitgangsmateriaal voor de bereiding van auxine gevonden. Natuurlijk had de isoleering uit

---

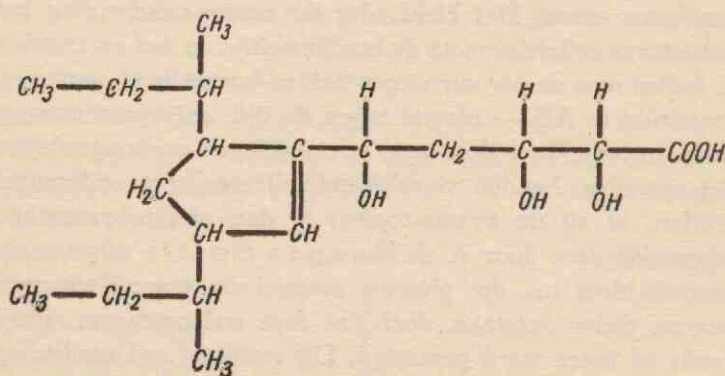
<sup>1)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. 220, 137 (1933).



een plantaardige olie het meeste interesse; er werd daarom een maïsolie opgewerkt, die reeds bij uitschudden met water of bicarbonaatoplossing haar groeistof afstond. Uit deze maïsolie hebben F. Kögl en medewerkers <sup>1)</sup> — werkende volgens het op urine beproefde schema — behalve het auxine-a nog een ander actief bestanddeel geïsoleerd, het auxine-b. Ook dit was optisch actief. De brutosamenstelling ervan bedroeg  $C_{18}H_{30}O_4$ , het smeltpunt was  $183^\circ C.$ , terwijl de activiteit even groot was als die van auxine-a, nl. 50 milliard AE per gram.

### 3. De structuurbepaling van auxine-a en auxine-b.

F Kögl en H. Erxleben <sup>2)</sup> kwamen op grond van hun onderzoekingen tot de volgende formule voor auxine-a:



I

auxine-a

De volgende gegevens leidden tot deze formulering:

1. Auxine-a is een zuur, dat een lacton vormt. Uit de snel-

<sup>1)</sup> F. Kögl, H. Erxleben en A. J. Haagen Smit, H. S. 225, 215 (1934).

<sup>2)</sup> F. Kögl en H. Erxleben, H. S. 227, 51 (1934).

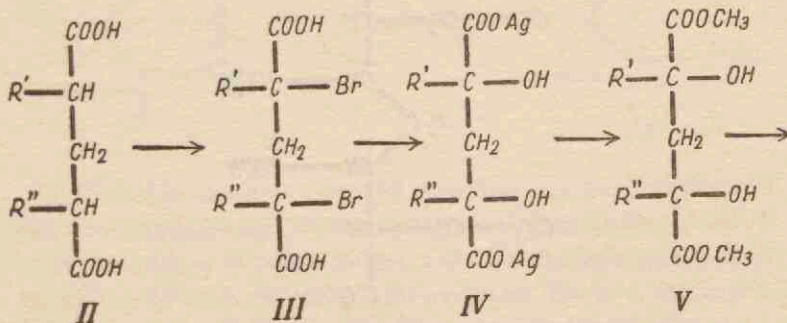
heid, waarmede zich het evenwicht lacton  $\rightleftharpoons$  zuur instelt, kon men besluiten tot een  $\delta$ -lacton.

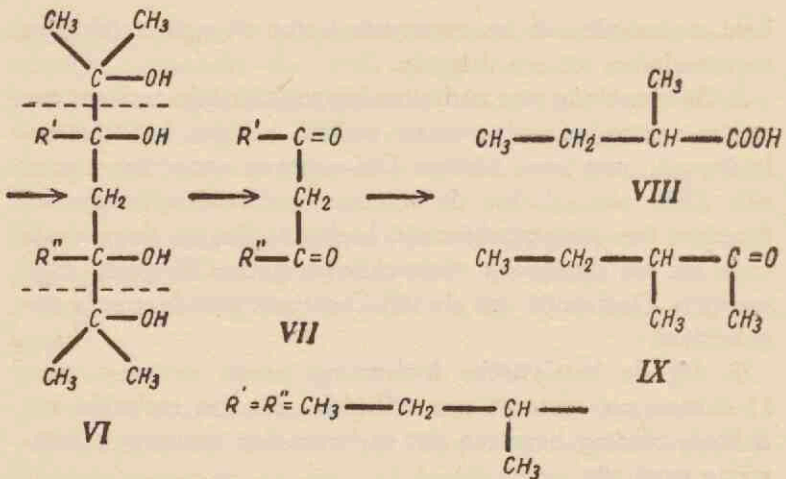
2. Bij inwerking van *m*-dinitro-benzoylchloride ontstaat een tri-(*m*-dinitro-benzoyl)-auxine, zoodat, behalve het „lactonhydroxyl”, nog twee verdere OH-groepen aanwezig moeten zijn. Daar een  $\gamma$ -lacton de voorkeur zou hebben boven een  $\delta$ -lacton, kon men tegelijkertijd besluiten, dat op de  $\gamma$ -plaats t.o.v. de carboxylgroep waarschijnlijk geen OH-groep aanwezig is. De functie van de vijf O-atomen was hiermede opgehelderd.

3. Bij de katalytische hydreeing neemt auxine-a twee H-atomen op, waaruit men afleidde, dat het molecule een dubbele binding bevat en dat er bovendien een ring in aanwezig moet zijn.

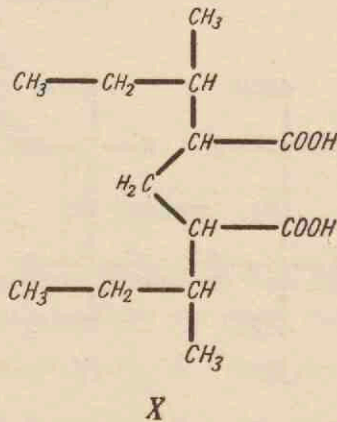
4. Bij alkalische oxydatie met kaliumpermanganaat ontstaat een dicarbonzuur van de samenstelling  $C_{13}H_{24}O_4$ . Door de reactie van Blanc kon aangetoond worden, dat dit door afbraak verkregen zuur een gesubstitueerd glutaarzuur is.

5. Om uit te maken op welke wijze het  $C_{13}$ -glutaarzuur gesubstitueerd is, werd het in een  $\alpha, \alpha'$ -dioxyzuur omgezet en de ester daarvan met methylmagnesiumjodide behandeld.





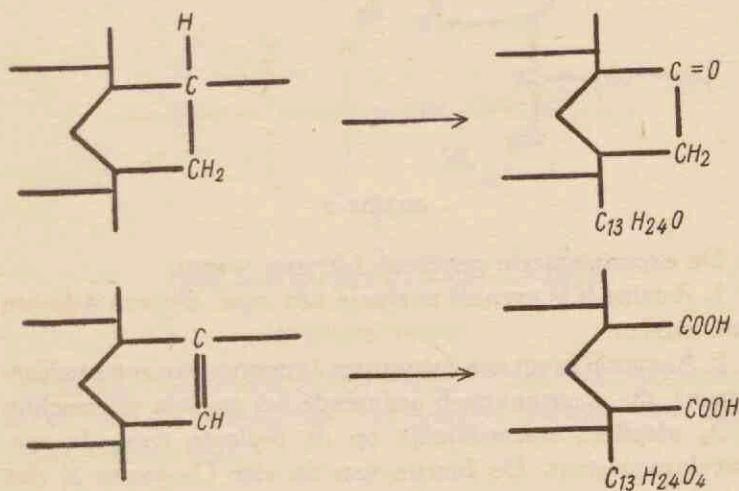
Het hierbij gevormde diglycol (VI) gaf bij oxydatie met loodtetraacetaat volgens Criegee een 1,3-diketon (VII). Door alkalisplitsing van dit diketon ontstond een rechtsdraaiend  $\alpha$ -methylboterzuur (VIII) en 3-methylpentanon-2 (IX). Daaruit volgt voor het  $\text{C}_{13}$ -dicarbonzuur de constitutie (X) van een  $\alpha, \alpha'$ -di-sec. -butylglutaarzuur.



6. Door oxydatie van dihydro-auxine-a met chroomzuur ontstaat een ringketon  $C_{13}H_{24}O$ .

Bij beide afbraakreacties verdwijnt dus een zuurstofhoudende  $C_5$ -rest.

Dit leidt tot de volgende conclusie: Op de plaats, waar deze  $C_5$ -rest van de ring aftakt, bevat de ring een dubbele binding. De carbonylgroep in het ringketon gaf de plaats aan, waar oorspronkelijk de  $C_5$ -rest vastgehecht was. De vorming van het  $C_{13}$ -zuur is aldus te verklaren, dat de oxydatie aan de dubbele binding plaats heeft; hierbij worden twee nieuwe carboxylgroepen gevormd, terwijl de hydroxyl- en carboxyl-dragende  $C_5$ -rest verwijderd wordt.



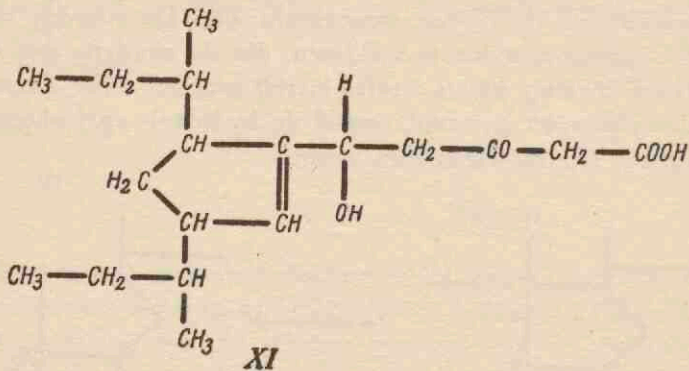
7. Dihydro-auxine-a geeft bij oxydatie met loodtetraacetaat een oxy-aldehyde met 16 koolstofatomen en daarnaast glyoxylzuur. Daaruit is te concluderen, dat twee hydroxylgroepen  $\alpha$ - en  $\beta$ -standig t.o.v. de carboxylgroep staan. De in 1. uitgesproken veronderstelling, dat zich het lacton-hydroxyl niet in  $\gamma$ -, maar in  $\delta$ -positie bevindt, wordt hierdoor eveneens bevestigd. Bij



de aanwezigheid van een hydroxylgroep op de  $\gamma$ -plaats zou nl. de glycolplitsing ook tusschen  $\beta$  en  $\gamma$  moeten plaats hebben.

Formule I voor auxine-a is dus in overeenstemming met alle tot nog toe gevonden feiten.

De structuurbepaling van auxine-b geschiedde langs overeenkomstige lijnen en leidde tot formuleering XI.



auxine-b

De experimenteele gegevens hiervoor waren:

1. Auxine-b is evenals auxine-a een zuur, dat een  $\delta$ -lacton kan vormen.

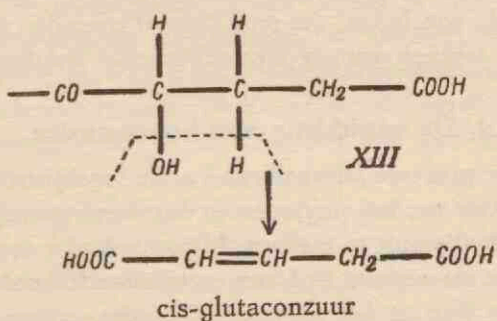
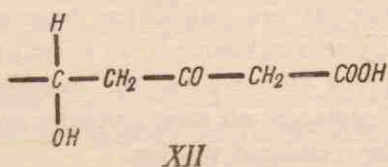
2. Auxine-b bevat een keto-groep (vorming van een semicarbazon), die, daar auxine-b gedurende het smelten stormachtig  $\text{CO}_2$  afsplitst, waarschijnlijk op de  $\beta$ -plaats t.o.v. de carboxylgroep staat. De functie van de vier O-atomen is dus opgehelderd.

3. Bij de katalytische hydreeing worden vier atomen waterstof geadderd, waarvan de twee laatste echter door de carbonylgroep opgenomen worden.

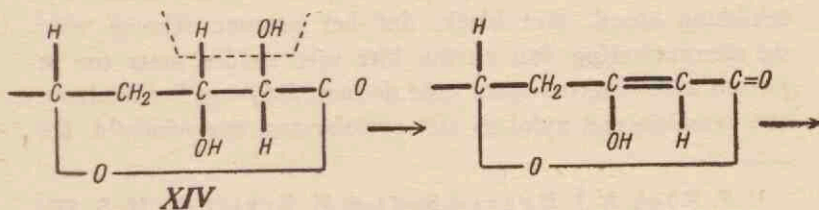
4. Bij de alkalische oxydatie met kaliumpermanganaat ontstaat een dicarbonzuur  $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$ , dat volkomen identiek is met het dicarbonzuur verkregen uit auxine-a.

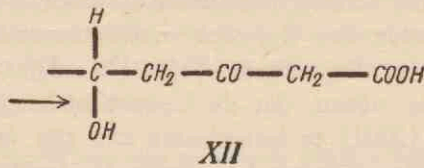


5. Bij oxydatie van het acetaliseeringsproduct van auxine-b kon men, behalve het  $C_{13}$ -zuur, cis-glutaconzuur isoleeren, dat uit de  $C_5$ -rest afkomstig moet zijn. Dit schijnt op het eerste gezicht erop te wijzen, dat de  $C_5$ -rest niet volgens (XII), maar volgens (XIII) te formuleeren zou zijn, terwijl de gemakkelijke vorming van een  $\delta$ -lacton en de afsplitsing van  $CO_2$  beter met formuleering (XII) in overeenstemming is.



Later werd gevonden, dat bij destillatie van auxine-a-lacton (XIV) met kaliumbisulfaat een product ontstaat, dat met auxine-b identiek is,





Daar over de richting van de waterafplitsing van het  $\alpha$ - en  $\beta$ -hydroxyl nauwelijks een twijfel kan bestaan, vormt deze omzetting van auxine-a in auxine-b een belangrijke steun voor de formuleering van auxine-b volgens formule XI. De vorming van het cis-glutaconzuur moet dan door intra-moleculaire atoomverschuiving verklaard worden.

Een overzicht van de interessante gegevens op optisch actief gebied en de conclusies, die men daaruit over de configuratie van auxine trekken kan, is hier achterwege gelaten.

#### 4. De ontdekking van hetero-auxine.

Ten einde grootere hoeveelheden urine tegelijkertijd te kunnen opwerken werden pogingen in het werk gesteld om een nieuwe methode uit te werken. Men vond, dat een aanzienlijk deel van de actieve stof aan verschillende koolsoorten te adsorberen was en hieruit door 60 %-ige aceton, waaraan 5 % geconcentreerde ammoniak was toegevoegd, weer geëluëerd kon worden.

Dit procédé <sup>1)</sup> werd voor het eerst toegepast op urine uit klinieken, omdat deze dagelijks in groote quantiteit ter beschikking stond. Het bleek, dat het gewone schema voor de concentreering van auxine hier niet zonder meer toe te passen was. Daarom werd voor de bereiding van het loodzout een extractie met xylol en met cyclohexaan ingeschakeld. De

<sup>1)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. 228, 90 (1934).

nu volgende lactoniseering verliep echter zeer onbevredigend: een groot gedeelte van de actieve stof werd gedurende het lactoniseeren vernietigd. Men trachtte daarom door de bereiding van andere metaalzouten een verdere concentreering door te voeren en inderdaad konden na bereiding van een bariumzout actieve kristallen worden afgezonderd. Deze vertoonden een zwakke optische activiteit, smolten bij  $164^{\circ}$  C. en bevatten tot groote verrassing stikstof. Hun bruto samenstelling was  $C_{10}H_9O_2N$ , hun werkzaamheid bedroeg  $\pm 20$  milliard AE per gram.

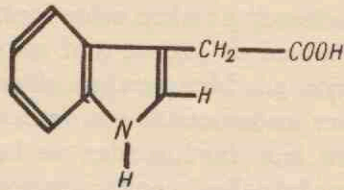
Nu was bekend, dat tryptophaan-paerparaten uit de handel een zwakke activiteit bezitten. In het vermoeden, dat men hier te doen had met een molecuulverbinding tusschen auxine eenerzijds en tryptophaan of een dergelijke stof anderzijds, werden verschillende kleurreacties op indolderivaten uitgevoerd, waarbij de voor  $\beta$ -indolyl-azijnzuur beschreven reactie met ferrichloride-zoutzuur <sup>1)</sup> intens positief uitviel.

Door een gefractioneerde adsorbtie aan calciumcarbonaat volgens T s w e t t kon uit het geïsoleerde product een onwerkzame optisch actieve verontreiniging worden afgezonderd. Het aldus gezuiverde materiaal bleek met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur volkomen identiek te zijn. Het bezat — evenals het synthetische product — een activiteit van ongeveer 25 milliard AE per gram. Deze nieuwe groeistof kreeg de naam *hetero-auxine*, om aan te geven, dat het hier om een chemisch geheel *ander* auxine gaat.

---

<sup>1)</sup> E. Salkowski, H. S. 9, 23 (1885).





XV

$\beta$ -indolyl-azijnzuur  
hetero-auxine

Het voorkomen van hetero-auxine in urine is gemakkelijk te verklaren, indien men bedenkt, dat tryptophaan door rottingsbacteriën tot  $\beta$ -indolyl-azijnzuur wordt afgebroken. C. Herter<sup>1)</sup> heeft zelfs reeds eenmaal  $\beta$ -indolyl-azijnzuur uit urine geïsoleerd bij een geval van abnormale darmflora. In normale urine heeft men slechts in 10 % van de gevallen  $\beta$ -indolyl-azijnzuur door kleurreacties kunnen aantoonen.<sup>2)</sup>

Om gevallen met een abnormaal hooge auxine-uitscheiding te verklaren, moesten F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben<sup>3)</sup> aannemen, dat auxine-a en auxine-b uit onbekende „Vorstufen” ontstaan. Dit schijnen nu de tryptophaanhoudende eiwitten te zijn, welke bij afbraak weliswaar geen auxine-a, maar hetero-auxine leveren. Daarmede wordt ook begrijpelijk, waarom de bereiding van auxine-a het best gelukt, wanneer de urine van gezonde, met stevige kost gevoede individuen gebruikt wordt.

<sup>1)</sup> C. Herter, J. of biol. Chem. 4, 239, 253 (1908).

<sup>2)</sup> H. Rosin, Virschows Arch. path. Anat. u. Physiol. 123, 519 (1891); Dtsch. med. Wschr. 19, 519 (1893).

M. Nencki en N. Sieber, J. prakt. Chem. 26, 333 (1892).

A. Garrod en F. Hopkins, J. of Physiol. 20, 112 (1896).

C. Herter, J. of biol. Chem. 4, 239, 253 (1908).

<sup>3)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. 220, 159 (1933).

Terwijl onder normale omstandigheden bij de ontlasting van de darm ook een groot deel van de darmflora regelmatig verwijderd wordt, kan in hongertoestand of bij zieken met een vertraagde ontlasting, het rottingsproces vollediger verlopen. Zoo is het te verklaren, dat de urine uit klinieken een minder geschikt uitgangsmateriaal is dan de urine van normale individuen.

Uit het achterwege blijven van een auxine-top nu het nuttigen van kippeneiwit is te concludeeren, dat de afbraak van proteïnen niet spontaan de vorming van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur ten gevolge heeft. Aan de andere kant werd nooit een auxine-vrije urine aangetroffen en blijft ook op een honger-dag een auxine-niveau bestaan, dat slechts zeer langzaam daalt. Men moet daaruit besluiten, dat dit auxine-niveau door de geleidelijke vorming van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur uit tryptophaan op peil gehouden wordt. In vitro is bij de inwerking van rottingsbacteriën op tryptophaan eerst na 24 uur  $\beta$ -indolyl-azijnzuur aan te toonen.

Op grond van het resultaat van de kleurreactie met ferri-chloride-zoutzuur mag men aannemen, dat de in normale urine voorkomende actieve stoffen voornamelijk uit auxine-a en slechts voor 20 % uit  $\beta$ -indolyl-azijnzuur bestaan. Zooals gezegd, is deze verhouding in urine uit klinieken ten gunste van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur verschoven en in een geval met abnormaal hooge auxine-uitscheiding heeft men kunnen aantonen, dat de actieve stof voor meer dan 75 % uit hetero-auxine bestond.

---



## TWEEDE HOOFDSTUK.

### AUXINEN UIT LAGERE PLANTAARDIGE ORGANISMEN

#### 1. De isoleering van het auxine uit gist.

In het eerste hoofdstuk is er op gewezen, dat urine voor de isoleering van het auxine het meest gunstige uitgangsmateriaal was. Dit nam evenwel niet weg, dat daarna ook getracht moest worden de auxinen uit plantaardig materiaal te bereiden. Door dieetproeven werd men gewezen op het hooge auxinegehalte van maïsolie en mout, waaruit dan naast auxine-a het nauw verwante auxine-b is geïsoleerd. Terwijl in het beginstadium van het groeistofonderzoek de grastoppen de eenige auxinebron vormden, vond N. Nielsen<sup>1)</sup>, dat een bij de avenacoleoptilen werkzame stof door de schimmels *Rhizopus suinus* Nielsen en *Absidia ramosa* aan hun voedingsbodems afgestaan wordt. F. Kögl en A. J. Haagen Smit<sup>2)</sup> vonden ook in andere *Rhizopus*-soorten, in cultures van *Bac. coli* en vooral ook in gist — althans in AE gemeten — betrekkelijk groote hoeveelheden auxine. Gelijktijdig heeft ook N. Nielsen<sup>3)</sup> op het auxine-gehalte van gist gewezen en P. Boysen-Jensen<sup>4)</sup> beschreef de vorming van

<sup>1)</sup> N. Nielsen, *Planta* 6, 376 (1928); *Jahrb. f. wiss. Bot.* 73, 189 (1930).

<sup>2)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, *H. S.* 214, 248 (1933).

<sup>3)</sup> N. Nielsen, *Biochem. Z.* 237, 244 (1931).

<sup>4)</sup> P. Boysen-Jensen, *Biochem. Z.* 236, 205, 239, 243 (1931) en 250, 270 (1932).

„Wachstumsregulatoren" bij *Aspergillus niger* en talrijke bacteriën. Nadat door de isoleering van auxine uit urine de activiteit van de kristallijne stof bekend was geworden, kon het gehalte aan auxine in de cultures van deze schimmels en bacteriën berekend worden, wanneer daarin tenminste door deze organismen eveneens auxine-a wordt afgescheiden. Zoo bleken 25000 l cultuurvloeistof van *Bac. coli*, 4000 l voedingsbodem van *Rhizopus nigricans* of 5000 l voedingsbodem van *Aspergillus niger* elk ongeveer 1 g auxine te bevatten.

Gunstiger waren de verhoudingen bij gist; deze had bovendien het voordeel, dat zij niet in het laboratorium zelf gekweekt behoefde te worden. Toch moesten wij er rekening mede houden, dat ook hier een twee millioen-voudige concentrering noodig was, vóór wij de actieve stof kristallijn in handen zouden hebben.

Wij onderzochten achtereenvolgens het waschwater, het autolysesap, het kooksap en het plasmolysesap van twee soorten bakkersgist — Koningsgist en Hollandiagist — op hun werkzaamheid. Onderstaande tabel geeft een overzicht van de gevonden activiteiten.

	Hollandiagist	Koningsgist
waschwater	5 000 000 AE/kg	1 500 000 AE/kg
autolysesap	6 000 000 AE/kg	5 000 000 AE/kg
kooksap	22 000 000 AE/kg	25 000 000 AE/kg
plasmolysesap	21 000 000 AE/kg	25 000 000 AE/kg

Bij een eerste poging bereidden wij het kooksap uit 150 kg Koningsgist door deze hoeveelheid met ruim 150 l water meerdere uren te koken. Gedurende het indampen trad een verlies aan actief materiaal op van ruim 80 % (een directe extractie met aether zou zeer groote hoeveelheden aether vereischt hebben). Gelukkig bleek, dat in het plasmolysesap evenveel auxine aanwezig was als in het kooksap, terwijl boven-

dien het te extraheeren volumen tot op de helft beperkt bleef.

Het plasmolysesap werd verkregen door aan gist ongeveer een tiende van haar gewicht aan ammoniumchloride toe te voegen en dit mengsel een nacht te laten staan. Het tamelijk dikvloeibare plasmolysaat werd met geconcentreerd zoutzuur aangezuurd en in scheidrechters meermalen met peroxyd-vrije aether uitgeschud, waarbij sterke emulgeering optrad. De aether bleek ongeveer twee derden van het in de gist aanwezige auxine te hebben opgenomen en wel had de door af-dampen van de aether verkregen strooperige rest een activiteit van  $\pm 60\,000\,000$  AE/g.

Voor de verdere opwerking pasten wij natuurlijk het op urine beproefde schema toe. De aether werd met een bicarbonaatoplossing gefractioneerd, waarbij de actieve stof, zooals te verwachten was, in de zuurfractie teruggevonden werd. Het residu van de zuurfractie werd uitgekookt met petroleum-aether en het in petroleum-aether onoplosbare deel, dat nog alle actieve stof bevatte, werd opgenomen in verdunde alcohol. De zoo verkregen oplossing schudden wij herhaalde malen met benzol uit. Dit benzol-extract bevatte ongeveer 70 % van de oorspronkelijk aanwezige actieve stof. Het werd op zijn beurt uitgeschud met water en met verdunde methanol. Deze laatste extracten voegden wij samen en extraheerden ze met aether. Tot dusverre toe werd dus voor de concentrering gebruik gemaakt van kleine oplosbaarheidsverschillen.

Uit het residu van de aetheroplossing bereidden wij een lood- en een calciumzout; de door middel van de test gevonden meest werkzame fractie, hetzij neerslag, hetzij filtraat, werd na de gebruikelijke opwerking door koken met abs. methanol-chloorwaterstof gelactoniseerd resp. veresterd. Terwyl deze behandeling bij de opwerking van urine geen noemenswaardig verlies met zich mede bracht, hadden wij hier altijd een deficit van ruim 60 % aan actieve stof, zoodat de uit 50 kg gist verkregen stroop nog slechts 1,5 mg auxine bevatte.



Daar deze hoeveelheid voor de fractioneering in hoogvacuum te gering was, hebben wij nog 100 kg gist in 2 porties op dezelfde wijze verwerkt om voor de hoogvacuumdestillatie voldoende materiaal te hebben.

De bij deze destillatie verkregen meest actieve fractie was een olie, die, ook na een tweede destillatie, door herhaaldelijk afkoelen met een aether-koolzuurmengsel niet tot kristallisatie te brengen was. De activiteit van deze olie bedroeg 5—6 miljard AE per gram. Een herhaling van de opwerking met 100 kg gist had eveneens een negatief resultaat.

Onder deze omstandigheden bestond er weinig hoop langs dezelfde weg tot isoleering van een gekristalleerd auxine uit gist te komen. Er waren nu immers reeds 400 kg gist opgewerkt zonder enig resultaat. De verdere bewerking van het probleem werd daarom uitgesteld.

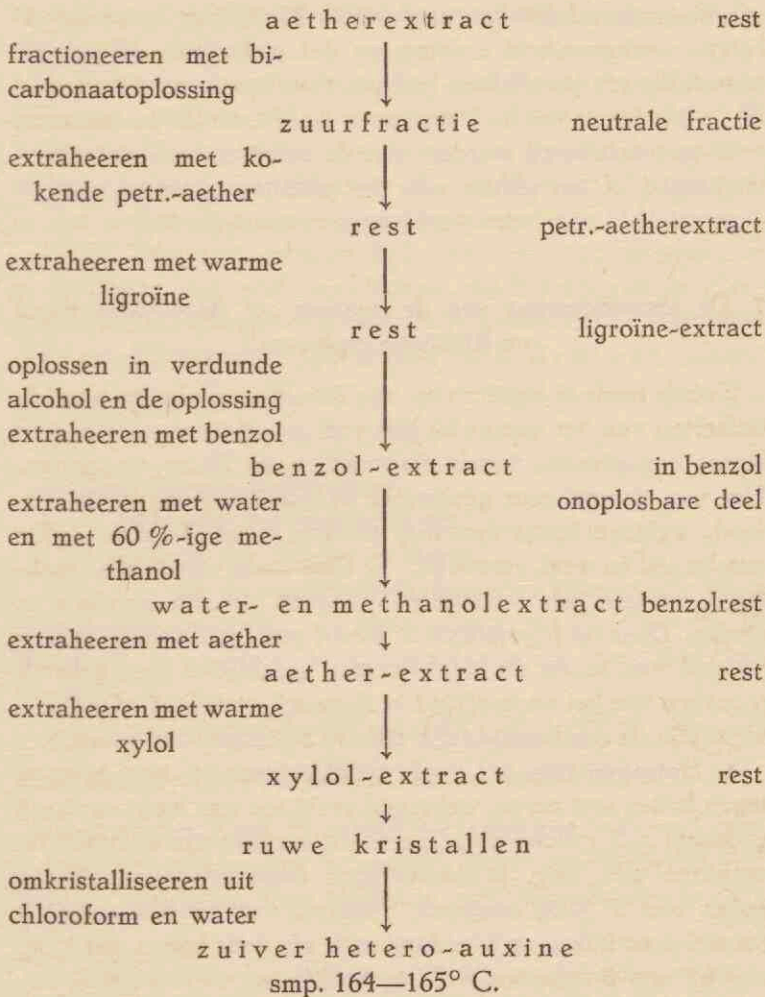
Door de ontdekking van hetero-auxine, welke intusschen plaats gevonden had, kwam ook het probleem van de isoleering van het auxine uit gist in een nieuw stadium. Zooals in het vorige hoofdstuk is uiteengezet, moet men aannemen, dat het optreden van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur in urine te danken is aan de inwerking van darmbacteriën op tryptophaanhoudende eiwitten. In ieder geval is het een feit, dat rottingsbacteriën tryptophaan kunnen omzetten in  $\beta$ -indolyl-azijnzuur, dus in een auxine. Het lag daarom voor de hand om aan te nemen, dat het vermogen deze omzetting tot stand te brengen niet tot deze micro-organismen beperkt is. Onafhankelijk van deze argumentatie pleitte een — tevoren onverklaarbaar — experimenteel gevonden feit ervoor, dat het auxine uit gist met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur identiek kon zijn. De tot hetero-auxine leidende opwerkingen van urine, evenals die van gist, toonden nl. bij de behandeling met methanol-chloorwaterstof een verregaande vernietiging van de actieve stof. De waarschijnlijkheid, dat het gezochte auxine uit de gist met hetero-auxine identiek was, werd daarmee steeds grooter.

Er werd nu 50 kg gist opgewerkt, waarbij wij gebruik maakten van de ervaringen, opgedaan bij de isoleering van het hetero-auxine uit urine. Wij werkten deze hoeveelheid op tot aan het loodzout, maar schakelden vóór de bereiding hiervan een extractie met warme xylol in. Wij verkregen zoo een olie, waaruit na een dag staan in de koelkast actieve kristallen uitkristalliseerden, welke bij het koken met ferrichloride-zoutzuur de voor  $\beta$ -indolyl-azijnzuur beschreven kleurreactie gaven. Deze kristallen waren echter nog zeer onzuiver: zij bezaten slechts een werkzaamheid van ongeveer 2 milliard AE per g. Zij werden driemaal uit chloroform omgekristalliseerd, dan tweemaal met petroleumaether uitgekookt en het onoplosbare gedeelte daarna nog tweemaal uit water omgekristalliseerd. De opbrengst bedroeg toen 9 mg, de werkzaamheid ongeveer 19 milliard AE per gram en ook dit product gaf een sterk positieve kleurreactie. Helaas ging een deel van deze kostbare stof verloren; de rest werd nog twee keer uit water omgekristalliseerd en had toen een smeltpunt van  $164-165^{\circ}$  C. Het mengsmeltpunt met synthetisch  $\beta$ -indolyl-azijnzuur gaf geen depressie en ook de physiologische activiteit kwam met die van het synthetische product overeen. Daar de identiteit van de beide verbindingen vaststond, kon van een herhaling van de isoleering afgezien worden, temeer daar in het volgende subkapittel onafhankelijke argumenten worden aangevoerd voor deze identiteit van het auxine uit gist met hetero-auxine.

De volgende tabel geeft een overzicht van de bewerkingen, die noodig waren om tot gekristalliseerd hetero-auxine te komen:

<i>bewerking:</i>	<i>hoofdfracties:</i>	<i>te verwaarloozen fracties:</i>
	plasmolyse sap	
aanzuren en extraheeren met aether	↓	





Het blijft nu nog de vraag, of de activiteit van de ruwe gistextracten uitsluitend te wijten is aan hetero-auxine, dan wel of naast  $\beta$ -indolyl-azijnzuur ook nog auxine-a en auxine-b een rol spelen. Uit het feit, dat de activiteit van de moederloog

van de actieve kristallen nog slechts 25 % van de oorspronkelijke werkzaamheid bedroeg en dat gedurende de geheele opwerking een paralleliteit bestond tusschen de werkzaamheid en de intensiteit van de kleurreactie met ferrichloride-zoutzuur, moet geconcludeerd worden, dat de activiteit van gistextract uitsluitend of ten minste voor het allergrootste deel, aan de aanwezigheid van hetero-auxine toe te schrijven is.

## 2. De identificeering van de auxinen uit *Aspergillus niger* en *Rhizopus nigricans*.

Zooals reeds is beschreven, zijn de omstandigheden voor de isoleering van het auxine bij gist veel gunstiger dan bij andere lagere organismen, zooals *Aspergillus*- en *Rhizopus*-soorten. Het was daarom zeer gewenscht de isoleering van de betreffende auxinen langs een weg te doen plaats vinden, welke minder tijd en werk vereischte. Te dien einde moest men trachten karakteristieke verschillen tusschen de drie auxinen te vinden. Daar op physiologisch gebied geen principieel verschil bekend was, moest dit identificeeren geschieden door gebruik te maken van het onderscheid in chemisch opzicht. Gelukkigerwijze zijn de omstandigheden daarbij buitengewoon gunstig.

1. Hetero-auxine is — als indolderivaat — niet bestand tegen koken met zuren, wel tegen verhitten met loog; auxine-a gedraagt zich precies omgekeerd: het verliest zijn activiteit bij verhitten met loog, is daarentegen ongevoelig voor 3 uur koken met 5 %-ig zoutzuur; auxine-b verliest zijn activiteit zoowel door koken met verdund zuur als door koken met loog, wat bij een  $\beta$ -ketozuur wel begrijpelijk is.

Door gebruik te maken van de biologische testmethode is het verschillend gedrag van de drie auxinen nog met zeer kleine hoeveelheden vast te stellen. Wanneer grootere hoeveelheden ter beschikking staan, kan natuurlijk ook nog de kleur-

reactie met ferrichloride-zoutzuur met goed gevolg gebruikt worden. <sup>1)</sup>

2. De moleculairgewichten van auxine-a en auxine-b zijn 328 resp. 310, terwijl dat van hetero-auxine slechts 175 bedraagt. Dit verschil is zoo groot, dat met de biologische moleculairgewichtsbepaling van F. W. Went uit te maken is, met welk auxine men te doen heeft.

F. W. Went <sup>2)</sup> ging de diffusiesnelheid van de groeistof in op elkaar gestapelde agarblokjes met behulp van de plantentest na. Hij slaagde erin de diffusie-coëfficiënt D te bepalen door gebruik te maken van de door H. R. Bruins <sup>3)</sup> aangegeven formule  $D = \frac{h^2}{tx}$ .

In deze formule stellen voor:

h = de hoogte der blokjes in cm,

t = de duur der diffusie in dagen,

x = een van de experimenteel bepaalde krommingshoeken afhankelijke grootheid, die met behulp van de door H. R. Bruins aangegeven formules en tabellen berekend kan worden.

Uit de aldus bepaalde diffusie-coëfficiënt vindt men dan het moleculairgewicht door middel van de formule  $\sqrt{M} = \frac{7}{D_{25^\circ}}$ .

Deze methode gaf in groote verdunningen van sterk verontreinigde praeparaten verrassend goede resultaten: F. W. Went stelde zoo voor auxine-a vast het moleculairgewicht 376.

<sup>1)</sup> Inmiddels is een nieuwe, en waarschijnlijk gevoeliger, kleurreactie op  $\beta$ -indolyl-azijnzuur beschreven door S. Winkler en S. Petersen, H. S. 231, 210 (1935).

<sup>2)</sup> F. W. Went, dissertatie Utrecht, 1927.

<sup>3)</sup> H. R. Bruins, dissertatie Utrecht, 1922; verg. ook J. Stefan, Sitzgsber. Kgl. Akad. Wien 79, 161 (1897) en W. Kawalki, Wied. Ann. 42, 185 (1894).



Dat deze proeven voor identificeeringsdoeleinden inderdaad te gebruiken zijn, werd aangetoond door het gevonden moleculairgewicht van het auxine uit gist (experimenteel 193 tegenover de theoretische waarde 175).

Alle hier aangegeven moleculairgewichten zijn op deze wijze bepaald door A. J. Haagen Smit, waarvoor wij hem ook op deze plaats onze hartelijke dank betuigen.

Het moleculairgewicht van de auxinen van *Aspergillus niger* en van *Rhizopus nigricans* werd bepaald, nadat wij de ruwe actieve stroopen hadden gezuiverd door ze te fractioneeren met bicarbonaatoplossing en de zuurfractie met petroleum-aether uit te koken. De gevonden moleculairgewichten waren: voor *Aspergillus niger* 169 en voor *Rhizopus nigricans* 176 en 190, overeenkomstig de waarde voor hetero-auxine.

Hiermede stemt het resultaat van de bestendigheidsprouven volkomen overeen. Het auxine uit *Aspergillus niger* bleek niet bestand te zijn tegen koken met zuur, wel tegen koken met loog, wat eveneens het geval is met het auxine uit *Rhizopus nigricans*. Wij moeten dus concludeeren dat de auxinen uit deze schimmels met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur identiek zijn.<sup>1)</sup>

Gelijktijdig met deze proeven werd door F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben<sup>2)</sup> met gelijke methoden aangetoond, dat in de toppen van grassen, het klassieke studieobject van het botanisch groeistofonderzoek, naar alle waarschijnlijkheid auxine-a gevormd wordt.

---

<sup>1)</sup> Na het afsluiten van deze dissertatie verscheen een mededeeling van K. V. Thimann, J. of Biol. Chem. 109, 279 (1935), waarin hij de door bovenstaande gegevens reeds vastgestelde identiteit van rhizopine met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur door isoleering van actieve kristallen bevestigde. De toegepaste werkwijze ter zuivering correspondeert in principe met de door ons uitgewerkte methodiek.

<sup>2)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. 228, 104 (1934).



Auxine uit:	Zuurbe- stendig:	Alkalibe- stendig:	Moleculair- gewicht:	Aard van het auxine:
<i>Aspergillus niger</i> .	neen	ja	169	hetero-auxine
<i>Rhizopus nigricans</i>	neen	ja	176,190	hetero-auxine
<i>Avena-coleoptilen</i>	ja	neen	346	auxine-a
gist . . . . .	—	—	193	hetero-auxine

P. Boysen-Jensen<sup>1)</sup> heeft het resultaat van zijn onderzoekingen over het auxine uit *Aspergillus* aldus samengevat, „dass der von *Aspergillus* gebildete Wachstumsregulator, der eine so auffällige Wirkung auf das Wachstum der *Avena*-Koleoptile hat, für *Aspergillus* selbst kein notwendiger Wachstumsfaktor ist; es ist, soweit man beurteilen kann, ein zufälliges Stoffwechselprodukt, das bisweilen gar nicht, unter geeigneten Kulturbedingungen aber in relativ grossen Mengen gebildet wird.“

Eenige jaren geleden hebben wij de proeven van Boysen-Jensen herhaald en — afgezien van een kleine, niet essentiële afwijking — volkomen kunnen bevestigen. Toentertijd scheen het ook ons merkwaardig, dat *Aspergillus* onder bepaalde omstandigheden een gecompliceerd hormoonmolecuul opbouwt, zonder dat dit voor zijn groei principieel noodzakelijk is. Deze omstandigheden verschijnen nu evenwel in een ander licht, daar het hier niet gaat om de synthese van auxine-a of -b, maar om de vorming van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur, dat bij niet-assimileerende organismen door afbraak van tryptophaan kan ontstaan.

In het beginstadium van het chemische „groeistof“-onderzoek was N. Nielsens rhizopine, een 7000-voudig geconcentreerd product uit *Rhizopus suinus*, het eerste gemakkelijker toegankelijke praeparaat voor verdere studies. Ook in de

<sup>1)</sup> P. Boysen-Jensen, Bioch. Z. 250, 270 (1932).

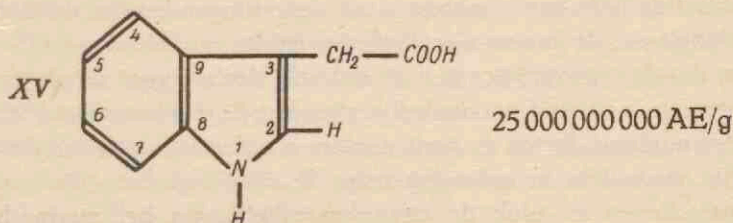
laatste tijd gebruikt men voor „groeistof”proeven in verschillende botanische laboratoria nog rhizopinepraeparaten, daar hiermede de botanici schijnbaar minder aan het gevaar bloot staan, dat zij met een aan de grascoleoptile vreemd auxine experimenteren. Zooals uit het bovenstaande evenwel blijkt, is het in werkelijkheid zoo, dat juist de lagere plantaardige organismen een ander auxine vormen dan de grassen zelf.

Het is een gelukkig toeval, dat uit urine, welke immers de beide auxinen bevat, eerst het „echte” auxine geïsoleerd is. Wanneer de eerste isoleeringspogingen tot  $\beta$ -indolyl-azijnzuur geleid hadden, zou men zich waarschijnlijk niet de moeite hebben gegeven ook nog de in de moederloogen voorkomende actieve stof af te zonderen. Met het gegeven, dat ook gist en andere lagere plantaardige organismen een met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur identiek auxine vormen, zou men zich waarschijnlijk hebben tevredengesteld en eventueele afwijkingen in het gedrag van het auxine uit grassen zouden op begeleidende stoffen zijn teruggevoerd; de auxinen -a en -b zouden dan nog lange tijd verborgen gebleven zijn.

---

## DERDE HOOFDSTUK.

### DE SPECIFITEIT VAN HETERO-AUXINE



$\beta$ -indolyl-azijnzuur

Het  $\beta$ -indolyl-azijnzuur — of indol-3-azijnzuur — was in de literatuur reeds bekend. Wij hebben het gesynthetiseerd volgens de methode van R. Majima en M. Kotake<sup>1)</sup> door op indolmagnesiumjodide chlooracetonitril te laten inwerken en het condensatieproduct te verzeepen.

In physiologisch opzicht is het hoogst merkwaardig, dat constitutioneel zoo verschillende stoffen als auxine-a en -b eenerzijds en hetero-auxine anderzijds, kwalitatief zoowel als quantitatief dezelfde werking uitoefenen. Weliswaar bedraagt de gemiddelde werkzaamheid van hetero-auxine (25 milliard AE/g) slechts de helft van auxine-a resp. -b (50 milliard AE/g), maar het lijkt niet onjuist bij het vergelijken van deze activiteiten met de moleculairgewichten rekening te houden en de „moleculaire activiteiten” kan men practisch aan elkaar gelijk stellen.

Voor de ontdekking van het hetero-auxine hadden F. Kög l

<sup>1)</sup> R. Majima en M. Kotake, Ber. 58, 2042 (1925).



en medewerkers alle reden de test van F. W. Went op te vatten als streng specifiek, daar de werkzaamheid van de auxinen -a en -b reeds door kleine veranderingen in het molecuul volkomen verloren ging. Wel toont het bestaan van auxine-a naast auxine-b aan, dat in de zuurstofhoudende C<sub>5</sub>-rest tenminste op de  $\alpha$ - en  $\beta$ -plaats 2 groepeeringsmogelijk zijn, die voor het fysiologisch effect van het molecuul dezelfde beteekenis hebben, doch daarentegen bewijst de inactiviteit van de auxine-a-methylester en die van dihydro-auxine-a, dat de carboxylgroep en de dubbele binding voor de fysiologische activiteit noodzakelijk zijn. Uit de werkzaamheid van het auxine-a-lacton is geen verdere conclusie te trekken, daar het evenwicht in oplossing naar de zijde van het vrije zuur verschoven is. Ook de onwerkzaamheid van het auxine-b-acetaal is in dit verband van interesse. Ten slotte moet nog op de binnen enkele maanden optredende inactivering van auxine-a en auxine-b gewezen worden. Ofschoon dit verschijnsel tot nu toe wegens gebrek aan materiaal nog niet nauwkeurig bestudeerd kon worden, staat toch al vast, dat men hier met een isomerisatie te doen heeft, waarbij de carboxylgroep en de dubbele binding behouden blijven. Dit is wel het merkwaardigste voorbeeld van de samenhang tusschen de constitutie en de werkzaamheid van de auxinen -a en -b.

Het was nu van veel belang om te onderzoeken in hoeverre de activiteit van hetero-auxine specifiek aan haar constitutie gebonden is. Terwijl het bij de auxinen -a en -b nog geruime tijd duren zal, voordat men synthetische varianten van deze moleculen ter beschikking heeft, is dit bij hetero-auxine nu reeds mogelijk, daar de groep van stoffen, waarmede men hier te doen heeft, synthetisch gemakkelijk toegankelijk is.

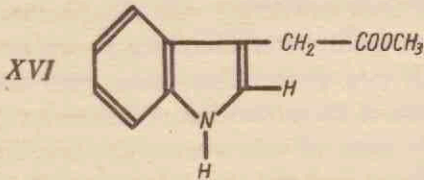
Bij het vergelijken van de werkzaamheid van de verschillende derivaten doen zich de bij de test van F. W. Went steeds optredende schommelingen in de gevoeligheid van de planten op verschillende dagen resp. uren op minder prettige



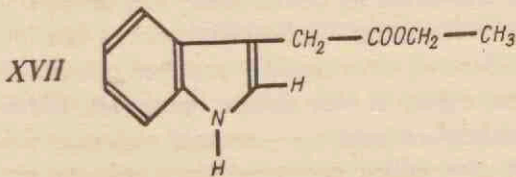
wijze gelden<sup>1)</sup>. Om ons althans eenigermate daarvan onafhankelijk te maken, hebben wij — zooals dat op ons laboratorium gebruikelijk is — alle activiteiten gestandaardiseerd, d.w.z. betrokken op een werkzaamheid van auxine-a van 50 milliard AE per gram. Bleek de werkzaamheid van auxine-a op een dag, dat de metingen werden verricht slechts 25 milliard AE per gram te bedragen, dan werd de gevonden activiteit van de onderzochte stof met twee vermenigvuldigd.

Bij synthetisch  $\beta$ -indolyl-azijnzuur vonden wij in de practijk activiteiten tuschen 8 milliard en 50 miliard AE per gram. De werkzaamheid van dit synthetische product werd over een periode van enkele maanden bepaald en op de genoemde wijze op auxine-a betrokken. De gemiddelde activiteit bedroeg 25 milliard AE per gram.

### 1. De beteekenis van de carboxylgroep.

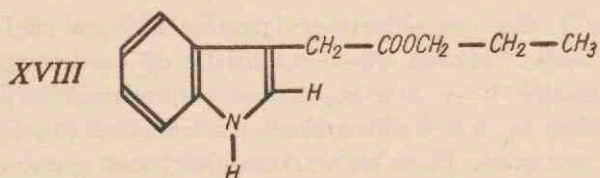


$\beta$ -indolyl-azijnzure methylester 10 000 000 000 AE/g

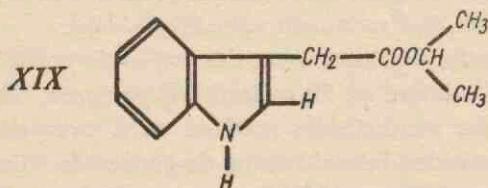


$\beta$ -indolyl-azijnzure aethylester 3 000 000 000 AE/g

<sup>1)</sup> Zooals uit het onderzoek van F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H.S. 220, 138 (1933), bekend is, schommelt de activiteit van standaardoplossingen tuschen  $10^{10}$  en  $10^{11}$  AE per gram, onafhankelijk van de zuiverheidsgraad van de auxine-oplossingen.



$\beta$ -indolyl-azijnzuren n-propylester 1 000 000 000 AE/g



$\beta$ -indolyl-azijnzuren iso-propylester 100 000 000 AE/g

Zoals boven vermeld is, verliest auxine-a door verestering met diazomethaan zijn werkzaamheid. De  $\beta$ -indolyl-azijnzuren methylester, die eveneens door inwerking van diazomethaan op het vrije zuur verkregen werd, bezit daarentegen een activiteit van 10 milliard AE per gram. Daar deze ester niet kristalliseert, werd nagegaan of de werkzaamheid aan een verontreiniging door het vrije zuur te wijten was. De over het pikraat gezuiverde ester bezat evenwel dezelfde activiteit.

Wij hebben  $\beta$ -indolyl-azijnzuren ook met methanol-chloorwaterstof veresterd, zoals dat bij de isoleering van het auxine uit gist bij de „lactoniseering” gebruikelijk was. Uit het reactie-mengsel konden wij door middel van het pikraat de methylester isoleeren, echter in zeer slechte opbrengst. Klaarblijkelijk wordt  $\beta$ -indolyl-azijnzuren — evenals andere indol-derivaten — in het zure milieu voor een groot gedeelte nog anderszins aangetast. Dit feit en de t.o.v. het vrije zuur met voor omstreeks 60 % verminderde werkzaamheid maken het begrijpelijk, dat bij de eerste pogingen om het auxine uit gist te isoleeren juist de „lactoniseering” een groot verlies aan activiteit met zich mede bracht.

De activiteit van de methylester van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur was tegenover de onwerkzaamheid van auxine-a-methylester des te verrassender, daar het carboxyl de eenige groep is, welke beide moleculen gemeen hebben. De vraag was nu: is de ester als zoodanig werkzaam of is de werkzaamheid toe te schrijven aan een gedeeltelijke verzeeping gedurende de inwerking op de plant? In het laatste geval zou dan de verzeeping van hetero-auxine-methylester veel sneller moeten plaats vinden dan die van de auxine-a-methylester <sup>1)</sup>.

Het was daarom van belang ook nog homologe esters, waarbij wij een kleinere verzeepingssnelheid konden verwachten, te onderzoeken. De door middel van diazoaethaan verkregen  $\beta$ -indolyl-azijnzure aethylester, welke eveneens over het pikraat werd gezuiverd, bezat een activiteit van 3 milliard AE per gram. Nog interessanter was het onderzoek van de n-propylester en de iso-propylester, daar bij deze goed met elkaar te vergelijken stoffen zeker een verschil in verzeepings-snelheid te verwachten was. De n-propylester welke met behulp van n-diazopropaan verkregen was, bezat een activiteit van 1 milliard AE per gram. De iso-propylester, verkregen door omzetting van het zilverzout van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur met iso-propyljodide, was 10 maal minder actief.

Helaas geeft de literatuur over de verzeepingssnelheden van verschillende esters door phytolipasen slechts weinig uitsluitel <sup>2)</sup>. Toch lijkt het ons waarschijnlijk, gezien de dalende activiteit van de beschreven homologe esters, dat hun werkzaamheid aan een gedeeltelijke verzeeping toe te schrijven is <sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> Natuurlijk hebben wij ons ervan overtuigd, dat de verzeeping van  $\beta$ -indolyl-azijnzure methylester niet reeds plaats heeft in de verdunningsvloeistof met welke wij de te onderzoeken oplossing ongeveer 12 uren voor de eigenlijke test bereidden.

<sup>2)</sup> W. Connstein, E. Hoyer en H. Wartenberg, Ber. 35, 3988 (1902).

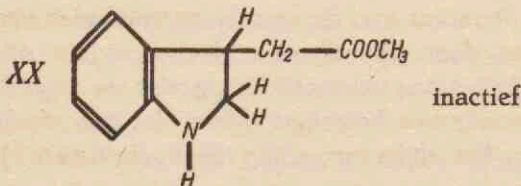
<sup>3)</sup> vgl. in dit verband de polariteitstheorie van F. W. Went, Jhrb. f. wiss. Bot. 76, 528 (1932).



Het blijft dan evenwel een raadsel, waarom de auxine-a-methylester niet eveneens een dergelijke partieele verzeeping ondergaat.

In verband met deze in beide auxinen aanwezige carboxyl-groep hebben wij getracht iets over de dissociatieconstanten van auxine-a en hetero-auxine te weten te komen. De gebruikelijke methode, het meten van het geleidingsvermogen, was in ons geval om verschillende redenen niet uitvoerbaar. Ten eerste waren de oplosbaarheden te gering, ten tweede stonden ons van auxine-a slechts enkele milligrammen ter beschikking en eindelijk bleek de oplossing van hetero-auxine gedurende de proef chemische veranderingen te ondergaan. Wij moesten ons daarom er mede tevreden stellen vergelijkende  $P_H$ -metingen in 0,001-molair oplossingen uit te voeren. Hierbij vonden wij voor auxine-a:  $K = 1 \times 10^{-5}$ , en voor hetero-auxine:  $K = 2 \times 10^{-5}$  <sup>1)</sup>. Uit de aard der zaak kunnen deze getallen niet nauwkeurig zijn, maar het blijkt toch, dat wij te doen hebben met dissociatieconstanten van dezelfde orde van grootte.

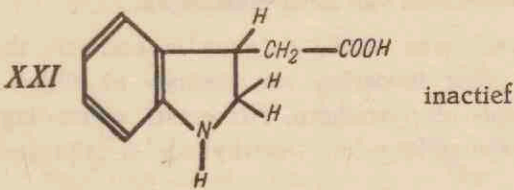
## 2. De beteekenis van de dubbele binding.



### 2,3-dihydro-indol-3-azijnzure methylester

<sup>1)</sup> K. Thimann en H. Dolk, Proc. Nat. Acad. Sciences 18, 30 (1932), vonden voor ruw „rhizopine” een  $K = 1,8 \times 10^{-5}$ . Ofschoon de toegepaste methodiek aan bedenkingen onderhevig is, komt deze waarde met ons eigen resultaat overeen.





2,3-dihydro-indol-3-azijnzuur

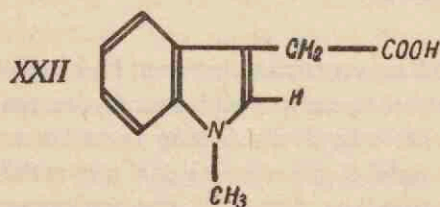
Een tweede vraag, die zich nu voordeed, was: gaat bij hetero-auxine evenals bij auxine-a de werkzaamheid door hydreeren verloren? Natuurlijk was het vooral van belang te weten te komen of het 2,3-dihydro-indol-3-azijnzuur al dan niet actief was. Door directe hydreering kon deze stof niet verkregen worden, omdat hierbij meer dan de berekende hoeveelheid waterstof werd opgenomen. Daarentegen kon — met de methode, welke door R. Robinson<sup>1)</sup> bij de hydreering van  $\beta$ -indolyl-boterzuur toegepast werd — uit de methylester van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur de 2,3-dihydro-indol-azijnzure methylester verkregen worden. Het pikraat hiervan werd viermaal uit alcohol omgekristalliseerd, maar de uit dit pikraat teruggewonnen ester bezat nog een activiteit, en wel van 34 miljoen AE per gram. Het lag voor de hand bij deze geringe activiteit aan de aanwezigheid van sporen  $\beta$ -indolyl-azijnzure methylester te denken. Voor de verdere zuivering werd daarom gebruik gemaakt van de grootere basiciteit van de dihydro-ester door de oplossing van het zwak actieve product in aether met zwavelzuur te fractioneeren. Na een verdere zuivering over het pikraat was de verkregen ester volkomen inactief.

Het uit deze ester door verzeeping met baryt bereide 2,3-dihydro-indol-3-azijnzuur (XXI) was eveneens biologisch onwerkzaam.

<sup>1)</sup> B. Blount en R. Robinson, Soc. 3158 (1931).

### 3. Het onderzoek van kern-homologen.

Onze volgende taak was nu na te gaan in hoeverre de activiteit verandert door invoering van methyl- of aethyl-groepen in de benzol- of pyrrolkern. Als eerste verbinding kwam daarvoor in aanmerking het 1-methylindol-3-azijnzuur (XXII).

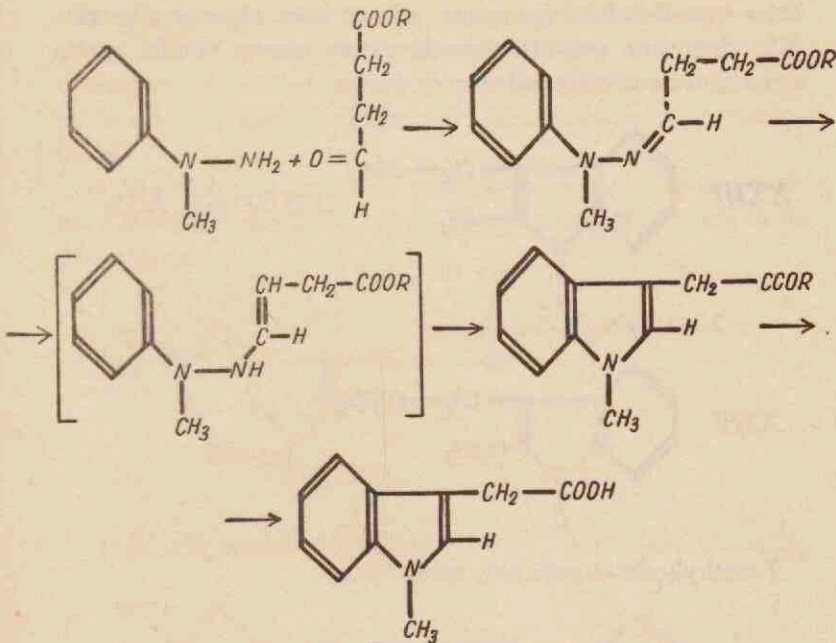


30 000 000 AE/g

1-methylindol-3-azijnzuur

Wij hebben dit zuur bereid volgens een voorschrift van A. Piccinini<sup>1)</sup> door 1-methylindol te condenseeren met diazo-azijnester en het condensatieproduct te verzeepen. Tot onze verrassing bezat dit zuur nog een — zij het zwakke — activiteit. Hoewel de gevolgde bereidingsmethode een verontreiniging door  $\beta$ -indolyl-azijnzuur eigenlijk buiten sloot, hebben wij ons hiervan toch trachten te overtuigen, door het zuur nog langs een andere weg te bereiden. Daartoe maakten wij gebruik van de door E. Fischer gegeven algemeene synthese van indolderivaten, welke hier aan het voorbeeld van 1-methyl-indol-3-azijnzuur weergegeven zij.

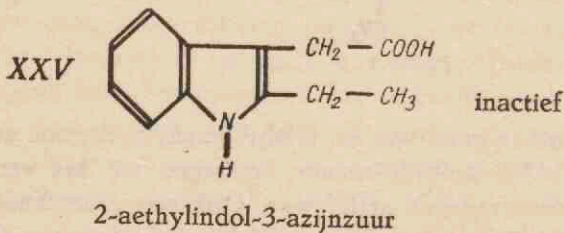
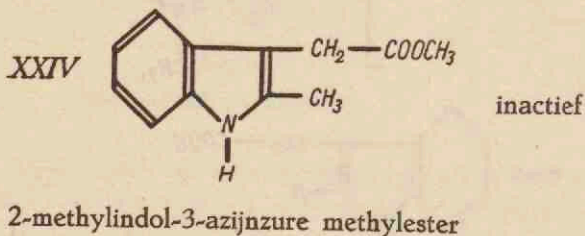
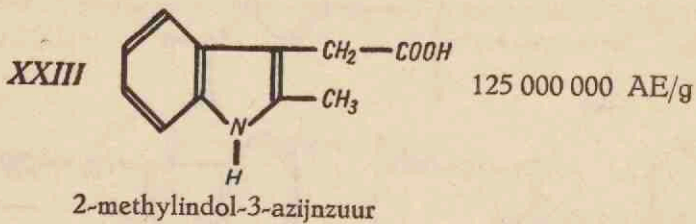
<sup>1)</sup> A. Piccinini, R.A.L. (5), 8<sup>1</sup>, 315 (1899).



Door aldus uit te gaan van as. methyl-phenylhydrazine en de ester van aldehydo-propionzuur verkregen wij het verlangde zuur, dat eveneens actief was. Ook een praeparaat, dat prof. R. Robinson zoo vriendelijk was ons toe te zenden, bezat eenzelfde werkzaamheid. Het schijnt dus, dat de invoering van een methylgroep aan het stikstofatoom de werkzaamheid wel sterk drukt, maar niet volkomen vernietigt.

Er rest ons nog te vermelden, dat de 1-methylindol-3-azijnzure aethylester, zooals die bij de bereiding van het zuur volgens A. Piccinini als tusschenproduct verkregen werd, volkomen inactief was. Eerst na de verzeeping ervan trad de genoemde physiologische werking op. Dit verschijnsel, dat

analoog is aan de verminderde werkzaamheid van de methylester van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur, schijnt zeer algemeen te zijn. Alle door ons gesynthetiseerde esters waren minder werkzaam dan de corresponderende zuren.



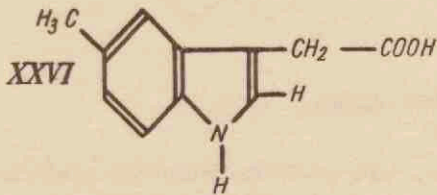
Behalve het stikstofatoom schijnt ook de vrije 2-plaats ( $\alpha$ -plaats) een belangrijke rol te spelen. Wij hebben in navolging van E. Fischer<sup>1)</sup> het 2-methylindol-3-azijnzuur (XXIII) bereid door het phenylhydrazon van laevulinezuur met  $\text{ZnCl}_2$  te smelten. Het zuur had een activiteit van 125 miljoen AE per gram; de methylester (XXIV) ervan, verkregen door

<sup>1)</sup> E. Fischer, A. 236, 146 (1886).



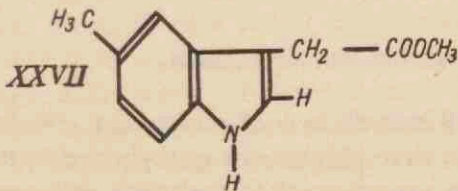
inwerking van diazomethaan op het vrije zuur, was inactief. Vervangt men de methylgroep op de  $\alpha$ -plaats door een aethylgroep (XXV), dan verdwijnt de activiteit volkomen. Dit 2-aethylindol-3-azijnzuur hebben wij bereid door het phenylhydrazon van homo-laevulinezuur met zwavelzuur te behandelen.

Is het molecuul dus zeer gevoelig voor substituties in de pyrrolo-kern, minder is dit het geval bij een substitueering in de benzolkern.



5-methylindol-3-azijnzuur

1 500 000 000 AE/g

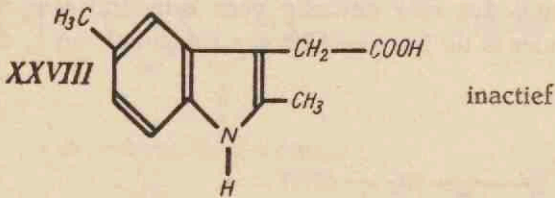


5-methylindol-3-azijnzure methylester

1 200 000 000 AE/g

Zoo bleek de activiteit van 5-methylindol-3-azijnzuur (XXVI) bereid door het p-tolylhydrazon van aldehydo-propionzure ester met zwavelzuur te behandelen, nog 1500 miljoen AE per gram te bedragen. De methylester ervan (XXVII), die weer door inwerking van diazomethaan op het vrije zuur werd verkregen, had een activiteit van 1200 miljoen AE per gram en is dus, zoo al niet veel, toch weer minder werkzaam dan het vrije zuur.

Het was nu te verwachten, dat de gelijktijdige invoering van twee methylgroepen, één in de benzolkern, de andere in de pyrrolkern, de activiteit volkomen zou opheffen. Een zuur, dat aan deze eisch voldoet is het 2,5-dimethylindol-3-azijnzuur (XXVIII),

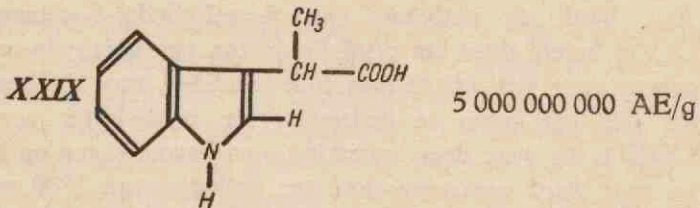


2,5-dimethylindol-3-azijnzuur

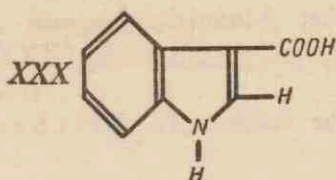
verkregen door inwerking van zwavelzuur op het p-tolylhydrazon van laevulinezuur. Inderdaad bleek deze verbinding inactief te zijn.

#### 4. De beteekenis van de zijketen.

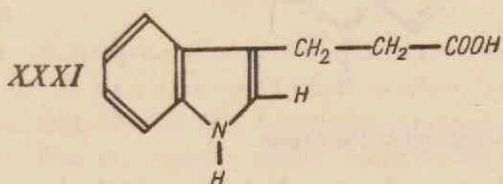
Ten slotte hebben wij nog de invloed onderzocht, die de zijketen uitoefent door in deze zijketen een methylgroep in te voeren en door haar te verkorten of te verlengen met een C-atoom.



$\alpha$ -( $\beta$ -indolyl)-propionzuur



inactief

 $\beta$ -indolyl-carbonzuur

inactief

 $\beta$ -indolyl-propionzuur

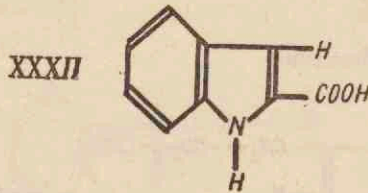
Het  $\alpha$ -( $\beta$ -indolyl)-propionzuur (XXIX), verkregen volgens een voorschrift van A. Ellinger<sup>1)</sup> door inwerking van zwavelzuur op het phenylhydrazon van aldehydo-isoboterzure ester, bezit nog de tamelijk sterke activiteit van 5 milliard AE per gram. De stof schijnt dus betrekkelijk ongevoelig te zijn voor deze vervanging van een H-atoom uit de zijketen door een methylgroep. Daarentegen is de lengte van de keten van doorslaggevende invloed, want zoowel het  $\beta$ -indolylcarbonzuur (XXX) als het  $\beta$ -indolylpropionzuur (XXXI) zijn beide onwerkzaam. Deze twee laatste zuren hebben wij bereid door volgens R. Majima en M. Kotake<sup>2)</sup> chloormierenzure ester resp. chloorpropionitril op indolmagnesiumjodide te laten inwerken en het reactieproduct te verzeepen. Het  $\beta$ -indolylpropionzuur verkregen wij bovendien nog volgens A. Ellinger<sup>1)</sup> door het phenylhydrazon van aldehydo-boterzure ester met zwavelzuur te behandelen.

<sup>1)</sup> A. Ellinger, Ber. 38, 2887 (1905).

<sup>2)</sup> R. Majima en M. Kotake, Ber. 55, 3870 (1922); 58, 2042 (1925); 63, 2240 (1930).

Ter vergelijking met het  $\beta$ -indolyl-carbonzuur (XXX) hebben wij ook nog het  $\alpha$ -indolyl-carbonzuur (XXXII) bereid.

Wij verkregen dit zuur volgens E. Fischer<sup>1)</sup> uit



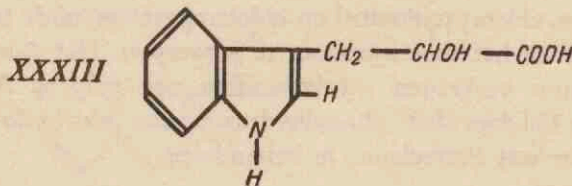
inactief

$\alpha$ -indolyl-carbonzuur

het phenylhydrazon van pyrodruivenzuur. Zooals te verwachten was, is dit zuur onwerkzaam.

### 5. Biologische afbraakproducten van tryptophaan.

In het Eerste Hoofdstuk hebben wij vermelding gemaakt van het feit, dat niet-assimileerende organismen uit tryptophaan-houdende eiwitten  $\beta$ -indolyl-azijnzuur kunnen vormen. Het lag dus voor de hand om ook enkele biologische afbraakproducten van tryptophaan te synthetiseeren en op hun activiteit te onderzoeken. Hiervoor kwamen in aanmerking het  $L$ - $\beta$ -indolyl-melkzuur (XXXIII) en het  $\beta$ -indolyl-pyrodruivenzuur (XXXIV), die door een hydrolytische resp. oxydatieve desaminering uit tryptophaan kunnen ontstaan.

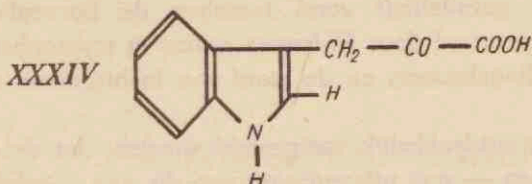


$L$ - $\beta$ -indolyl-melkzuur

inactief

<sup>1)</sup> E. Fischer, A. 236, 142 (1885).



 $\beta$ -indolyl-pyrodruivenzuur

200 000 000 AE/g

Het *l*- $\beta$ -indolyl-melkzuur bereidden wij volgens F. Ehrlich en P. Jacobsen<sup>1)</sup>, door *Oidium lactis* een maand lang te kweken op een *l*-tryptophaan-houdende voedingsbodem. Het na enkele malen omkristalliseeren verkregen zuivere *l*- $\beta$ -indolyl-melkzuur was bij de test volkomen inactief, evenals het *rac.*- $\beta$ -indolyl-melkzuur, dat uit de linksdraaiende vorm verkregen werd door autoclaveeren met baryt volgens een voorschrift van K. Ichihara en N. Iwakura<sup>2)</sup>. Daarentegen bezat het  $\beta$ -indolyl-pyrodruivenzuur een activiteit van 200 miljoen AE per gram. Dit zuur werd verkregen door opensplitsen van het az-lacton uit hippuurzuur en  $\beta$ -indolaldehyde volgens A. Ellinger en Z. Matsuoka<sup>3)</sup>. Een verontreiniging door  $\beta$ -indolyl-azijnzuur mogen wij — gezien de gevolgde bereidingsmethode — wel uitgesloten achten. Bovendien bezaten drie door verschillende personen bereide praeparaten van dit zuur dezelfde activiteit. Wij mogen dus aannemen, dat de plant een oxydatief-decarboxyleerende werking uitoefent, waardoor uit  $\beta$ -indolyl-pyrodruivenzuur ten deele hetero-auxine ontstaat. Deze werking is echter slechts zeer zwak, want een minder ver geoxydeerd product —  $\beta$ -indolyl-melkzuur — wordt er niet door beïnvloed. In dit verband is het interessant er op te wijzen, dat K. Th i

1) F. Ehrlich en P. Jacobsen, Ber. 44, 888 (1911).

2) K. Ichihara en N. Iwakura, H. S. 195, 202 (1931).

3) A. Ellinger en Z. Matsuoka, H.S. 109, 259 (1920).

mann<sup>1)</sup> een paralleliteit vond tusschen de hoeveelheid hetero-auxine gevormd door *Rhizopus suinus* in tryptophaanhoudende voedingsbodems en de mate van luchttoevoer aan deze cultures.

Er moet hier uitdrukkelijk vastgesteld worden, dat de gegeven activiteiten — met uitzondering van die van  $\beta$ -indolyl-azijnzuur zelf — de gemiddelde waarden zijn uit slechts een vijftal metingen. Het spreekt daarom wel vanzelf, dat bij langer uitmeten de cijfers nog wel eenige verandering kunnen ondergaan.

Als drempelwaarde hebben wij aangenomen een activiteit van 10 millioen AE per gram, d.w.z.: een stof wordt dan als onwerkzaam beschouwd, wanneer zij in een concentratie van 1 mg in 20 cm<sup>3</sup> water geen duidelijke kromming van de coleoptile meer tengevolge heeft. Een activiteit van 10 millioen AE per gram zou overeenkomen met een verontreiniging aan  $\beta$ -indolyl-azijnzuur van ongeveer 0,03 %. Een dergelijke verontreiniging komt noch in het smeltpunt, noch in de analysecijfers tot uiting en zal ook door omkristalliseeren moeilijk te verwijderen zijn. Het spreekt aan de andere kant vanzelf, dat wij door de gevolgde werkwijze gezorgd hebben een „besmetting” met  $\beta$ -indolyl-azijnzuur uit te sluiten.

---

<sup>1)</sup> K. Thimann, J. of Biol. Chem. 109, 279 (1935);  
vgl. ook D. Woods, Biochem. J. 29, 640, 649 (1935).

## SLOTBESCHOUWINGEN

Het is al hoogst eigenaardig, dat twee zoo verschillende stoftypen als auxine-a (of -b) en hetero-auxine, welke in hun bouw geenerlei overeenkomst bezitten, bij de celstrekking dezelfde werking uitoefenen. Nog merkwaardiger is het echter, dat deze gelijksoortige werking niet hiertoe beperkt blijft, maar zich ook uitstrekt over andere planten-physiologische verschijnselen.

Zooals bekend is, regelt het auxine uit de toppen van grassen niet alleen de gewone celstrekking, maar bemiddelt het bovendien de photo- en geotropische krommingen, zooals F. W. Went<sup>1)</sup> en H. Dolk<sup>2)</sup> hebben aangetoond. F. Kögl en medewerkers<sup>3)</sup> stelden vast, dat niet alleen gekristalliseerd auxine-a deze functie van het auxine uit de grastoppen kan overnemen, maar dat ook hetero-auxine in staat is aan de gedecapiteerde coleoptile, die b.v. op zwaartekrachtprikkels niet meer reageert, deze verloren gevoeligheid terug te geven.

De negatieve geotropie van de spruit komt tot stand, doordat de zwaartekracht de transportrichting van het auxine beïnvloedt. De onderzijde van een horizontaal gelegde coleoptile ontvangt meer auxine, zoodat de spruit zich opricht. N. Cholodny<sup>4)</sup> neemt aan, dat de positieve geotropie

<sup>1)</sup> F. W. Went, Rec. Trav. Bot. néerl. 25, 1 (1928).

<sup>2)</sup> H. Dolk, dissertatie Utrecht, 1930.

<sup>3)</sup> F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H.S. 228, 104 (1934).

<sup>4)</sup> N. Cholodny, Jahrb. f. wiss. Bot. 65, (1926); Planta 6, (1928); (1928); Ber. dtsch. bot. Ges. 51, 85 (1933).



van de wortel op analoge wijze tot stand komt. Deze auteur heeft nl. reeds eenige tijd geleden een remming van de wortelgroei door het ruwe extract uit de grastoppen geconstateerd. Als *eenzelfde* auxine de groei van de coleoptile versnelt en de groei van de wortel remt, zou de geotropische prikkel eveneens aan de onderzijde van een horizontale wortel een opeenhooping van auxine doen ontstaan. Daardoor zal de minder geremde bovenzijde sterker gaan groeien, waarmede de positieve geotropie van de wortel verklaard is. In dit verband is het van belang, dat F. K ö g l en medewerkers <sup>1)</sup> hebben geconstateerd, dat een oplossing, die 0,1  $\gamma$  gekristalliseerd auxine-a bevat, nog een duidelijke remming van de wortelgroei teweeg brengt. Deze zelfde remmende werking wordt ook door hetero-auxine, zij het in mindere mate, uitgeoefend. De concentratie, die noodig is om een remming van de lengtegroei van de wortel teweeg te brengen, bedraagt hier 10  $\gamma$  per liter.

Als pendant van de „wortel-remmende” werking der auxinen vonden K. Thimann en F. Skoog <sup>2)</sup>, dat ook de ontwikkeling van de laterale knoppen van *Vicia faba* zowel door auxine-a als door hetero-auxine geremd wordt.

F. W. Went <sup>3)</sup> bestudeerde wortelvormende stoffen en vond, dat zij in hun chemisch gedrag een vrij groote overeenkomst met de auxinen vertoonen. Naderhand kon hij met behulp van twee der in het laboratorium te Utrecht bereide kristallijne auxinen — auxine-a en hetero-auxine — aantoonen, dat deze inderdaad wortelvorming teweeg brengen. Terwijl F. W. Went bij deze proeven hoofdzakelijk met *Pisum* experimenteerde vond F. Laibach <sup>4)</sup>, dat ook in-

<sup>1)</sup> F. K ö g l, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H.S. 228, 104 (1934).

<sup>2)</sup> K. Thimann en F. Skoog, Proc. Nat. Acad. of Sciences 19, 714 (1933).

<sup>3)</sup> F. W. Went, Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam 32, 1 (1929).

<sup>4)</sup> F. Laibach, Naturwiss. 35, 588 (1934).



ternodiën van *Tradescantia* geschikt zijn om wortelvormende stoffen aan te toonen. F. K ö g l en A. J. H a a g e n S m i t <sup>1)</sup> onderzochten gekristalliseerd auxine-a en hetero-auxine met behulp van deze door F. L a i b a c h beschreven test en vonden, dat beide in zeer kleine doses werkzaam zijn. Wij hebben dus ook hier weer met een gelijksoortige werking van de beide auxine-typen te doen.

F. K ö g l heeft naar aanleiding van de ervaringen, die in de laatste jaren op het gebied der geslachtshormonen zijn opgedaan, het bekende beeld van E m i l F i s c h e r aldus gevarieerd, dat bij deze hormonen „das ‚Schloss‘ nicht nur durch den ‚klassischen Schlüssel‘, sondern auch durch weniger gut funktionierende Nachschlüssel oder gar Dietriche geöffnet werden kann.....” Na de ontdekking van hetero-auxine kwam hij op een lezing op dit beeld terug; hij concludeerde, dat men hetero-auxine niet als „looper” mag beschouwen, daar dit het „slot” te gemakkelijk opent, en beschrijft de situatie als volgt: „.....wir gebrauchen immer nur das unverwüstliche Bild vom Schloss und denken nicht an die Tür und die Kammer, die wir aufschliessen wollen. Eine Kammer kann aber auch einmal eine zweite Tür — vielleicht sogar eine Hintertür — haben, die durch einen eigenen Schlüssel geöffnet wird!”

Het zal de taak zijn van het toekomstig auxine-onderzoek om na te gaan of dit beeld van de „Hintertür” in biologisch opzicht een reële beteekenis heeft.

<sup>1)</sup> F. K ö g l, Ber. A. 68, 16 (1935).

## EXPERIMENTEEL GEDEELTE

### 1. De isoleering van het auxine uit gist.

#### *A. Isoleering uit het kooksap.*

150 kg Koningsgist (Delft) werden in 6 porties in zinken teilen met een zelfde hoeveelheid water gekookt gedurende 6 tot 7 uren. Na afkoelen en bezinken werd de bovenstaande heldere vloeistof zoo goed mogelijk afgeheveld. De resteerende gistbrij was niet te filtrereen door filtreerpapier, zand of linnen. Ook toevoegen van alcohol gaf geen betere afzetting van het celmateriaal, zoodat wij de vaste bestanddeelen met behulp van een Sharpless-centrifuge moesten afscheiden. De op deze wijze verkregen heldere oplossing werd in een apparaat volgens Schmalzuss-Janssen<sup>1)</sup> in vacuo ingedampt tot op ongeveer 10 l. Het bleek, dat deze 10 l nog slechts 20 % van de oorspronkelijke aanwezige hoeveelheid auxine bevatten. Deze opwerking werd daarom niet verder voortgezet.

#### *B. Isoleering uit het plasmolysesap.*

Het plasmolysesap werd opgewerkt volgens de methode, die tot de isoleering van auxine-a uit urine had geleid. De gist bevatte 17 000 000 AE/kg.

##### 1) Bereiding van het plasmolysesap.

50 kg gist werden fijngebrokkeld en met ongeveer 5 kg poedervormig secundair ammoniumphosphaat bestrooid. Na een nacht staan bij kamertemperatuur werd aangezuurd met

<sup>1)</sup> Chem. Fabrik, 387 (1929).

ongeveer 20 cm<sup>3</sup> geconc. HCl tot zure reactie op congopapier. Bij het aanzuren trad een heftig bruisen op. Daarom zijn wij naderhand overgegaan tot een plasmolyse met ammoniumchloride, die bovendien het voordeel had, dat het verkregen sap nog iets dunner was dan dat, verkregen met secundair ammoniumphosfaat. Het dikvloeibare plasmolysaat liet zich niet dan met groote activiteitsverliezen — door adsorptie van het auxine aan de vaste bestanddeelen — centrifugeeren. Wij hebben het daarom onmiddellijk geëxtraheerd met peroxyd-vrije aether <sup>1)</sup>.

### 2) Extractie met aether.

De beste methode was, dat wij eerst de brij van 1 kg gist met ongeveer 700 cm<sup>3</sup> aether tot een emulsie schudden en deze emulsie daarna drie malen met telkens 600 cm<sup>3</sup> aether extraheerden. Wij gebruikten dus 2,5 l aether per kg gist of 125 l per portie van 50 kg. Het verzamelde aetherextract werd boven Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gedroogd en ingedampt. Het residu woog ± 10 g en had een activiteit van 60 000 000 AE/g. Ongeveer 70 % van de totaal aanwezige hoeveelheid auxine was dus in het extract overgegaan, nl. 12 mg <sup>2)</sup>.

### 3) Fractioneering met bicarbonaatoplossing.

Het aether-residu werd weer in aether opgenomen, het volumen gebracht op ongeveer 5 l en deze oplossing drie malen uitgeschud met 5 %-ige bicarbonaatoplossing. Het bicarbonaatextract zuurden wij aan met ijsazijn en schudden het daarna drie malen met aether uit. De aether werd gedroogd boven Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en afgedampt. Het residu woog ± 4,6 g en

---

<sup>1)</sup> G. Garbarini, C. 1126 (1909); N. Milas, Am. Soc. 53, 221 (1931). Wij hebben steeds peroxydvrije aether gebruikt, ook daar, waar eenvoudigheidshalve van aether sprake is.

<sup>2)</sup> Wij rekenden indertijd met een activiteit van 50 milliard AE per gram gekristalliseerd auxine. Om een beter denkbeeld te geven van het probleem, zooals het zich toen aan ons voordeed, hebben wij deze cijfers hier gehandhaafd. In werkelijkheid waren 24 mg auxine aanwezig.



had een activiteit van 120 000 000 AE/g. Er waren dus nog 11 mg auxine aanwezig.

4) Extractie met petroleumaether.

Het aether-residu werd gedurende een half uur gekookt met versch gedestilleerde petroleumaether (kpt. 40—60° C.). Na afkoelen werd voorzichtig gedecanteerd en de extractie nog twee malen herhaald. Daarna werd, geheel op dezelfde wijze, drie malen uitgekookt met petroleumaether (kpt. 60—80° C.). Het in petroleumaether onoplosbare deel woog 2,3 g en bezat een activiteit van 130 000 000 AE/g. Er waren dus nog 6 mg auxine aanwezig. De verdwenen milligrammen werden teruggevonden bij het in petroleumaether oplosbare deel. Het bleek, dat door de aanwezige vetzuren (boterzuur) het auxine gedeeltelijk in de petroleumaether werd medegenomen. Deze vetzuren konden wij verwijderen door voor het uitkoken een vacuümdistillatie in te lasschen, waarbij op 100° C. werd verhit, zoodat de vetzuren overdestilleerden.

5) Extractie met benzol.

Het stroopje werd opgelost in 100 cm<sup>3</sup> 60 %-ige aethylalcohol en 15 malen met telkens 15 cm<sup>3</sup> versch gedestilleerde benzol uitgeschud. Het verzamelde benzolextract schudden wij daarop drie malen uit met telkens 75 cm<sup>3</sup> water en vervolgens nog drie malen met telkens 75 cm<sup>3</sup> 50 %-ige methanol. Dit laatste extract werd, om de methanol te verwijderen, in vacuo ingedampt tot ongeveer een vijfde van zijn oorspronkelijk volumen, dan gevoegd bij het waterextract en het geheel vier malen uitgeschud met aether. Na drogen boven Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en afdampen kregen wij uit deze aether 800 mg stroop met een activiteit van 250 000 000 AE/g, zoodat nog 4 mg auxine voorhanden waren.

6) Bereiding van het lood- en het calciumzout.

Wij namen de stroop op in 20 cm<sup>3</sup> alcohol en voegden een geconcentreerde oplossing van 5 g neutraal loodacetaat in water toe. Het gevormde neerslag bevatte haast geen auxine



en werd weggeworpen. Bij het filtraat voegden wij druppels-gewijze 30 %-ige natronloog tot zwak alkalische reactie op broomthymolblauw. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd en filtraat en neerslag gescheiden opgewerkt. Zij werden beide opgenomen in ijsazijn en de verkregen oplossingen werden uitgeschud met aether. De na afdampen van de aether en het azijnzuur verkregen stroopjes bleken bij het testen geen noemenswaardige zuivering te hebben ondergaan. Zij werden daarom weer samengevoegd en opgelost in 10 cm<sup>3</sup> alcohol. Aan deze oplossing voegden wij 100 cm<sup>3</sup> water toe, dan een geconcentreerde oplossing van calciumacetaat in water en tenslotte druppelden wij n-KOH toe, tot bij verder toevoegen geen neerslag meer ontstond. Het neerslag werd afgecentrifugeerd en achtereenvolgens met water, alcohol en water gewasschen. In het uitgewasschen neerslag was haast geen auxine aanwezig. Het centrifugaat leverde na aanzuren, uitschudden met aether en afdampen van de aether 500 mg stroop, met een werkzaamheid van 400 000 000 AE/g.

Aanwezig waren nog 4 mg auxine.

#### 7) Lactoniseering.

Het stroopje werd opgenomen in 5 cm<sup>3</sup> abs. methanol, welke 1,5 gewichtsprocent HCl bevatte en gedurende een half uur op een waterbad gekookt. Na afdampen in vacuo werd het residu opgenomen in aether en deze oplossing twee malen met 2 %-ige bicarbonaatoplossing en twee malen met water uitgeschud. In de extracten was geen auxine aanwezig. Het residu uit de aether woog 375 mg en had een activiteit van 200 000 000 AE/g. Aanwezig waren dus nog 1,5 mg auxine.

In de onderstaande tabel zijn de gegeven cijfers overzichtelijk samengevat.

	Gewicht van de actieve fractie in mg:	Activiteit in AE/mg:	Totaal aanwezig auxine in mg:
1. plasmolysesap . . . . .	—	17	17
2. aetherextract . . . . .	10 000	60 000	12
3. bicarbonaatextract . . . . .	4 600	120 000	11
4. residu na uitkoken met petroleumaether . . . . .	2 300	130 000	6
5. benzolextract . . . . .	800	250 000	4
6. na Pb- en Ca-zout . . . . .	500	400 000	4
7. na lactonisering . . . . .	375	200 000	1,5

Op geheel dezelfde wijze hebben wij nu nog twee maal 50 kg gist opgewerkt. De gemiddelde activiteit van deze gist bedroeg resp. 20 en 23 miljoen AE/kg. De cijfers voor deze tweede en derde opwerking waren:

	Gewicht van de actieve fractie in mg:	Activiteit in AE/mg:	Totaal aanwezig auxine in mg:
1. plasmolysesap . . . . .	—	20	20
2. aetherextract . . . . .	12 000	60 000	14
3. bicarbonaatextract . . . . .	3 800	160 000	13
4. residu na uitkoken met petroleumaether . . . . .	3 000	210 000	12
5. benzolextract . . . . .	500	750 000	8
6. na Pb- en Ca-zout . . . . .	300	1 300 000	8
1. plasmolysesap . . . . .	—	23	23
2. aetherextract . . . . .	20 000	40 000	16
3. bicarbonaatextract . . . . .	4 400	170 000	15
4. residu na uitkoken met petroleumaether . . . . .	1 900	400 000	15
5. benzolextract . . . . .	500	1 100 000	11
6. na Pb- en Ca-zout . . . . .	350	1 400 000	10

De aldus verkregen producten werden vereenigd en tesamen gelactoniseerd. Na opwerken resulteerde een stroopje met een activiteit van 500 000 000 AE/g. De totale hoeveelheid stroop bedroeg 600 mg, zoodat nog slechts 6 mg auxine aanwezig waren. Deze 600 mg hebben wij in twee porties in hoogvacuum gedestilleerd. De meest actieve fractie destilleerde bij 125—140° C. en 0,01 mm druk over en had bij de test een activiteit van 5 000 000 000 AE/g. Tot kristallisatie kon dit destillaat niet gebracht worden. Daarom werd het product nog eens in hoogvacuum gedestilleerd, doch ook het nieuwe destillaat kristalliseerde niet na herhaaldelijk afkoelen met een mengsel van vast koolzuur-aether.

Een tweede poging met nogmaals 100 kg gist verliep nog slechter. Reeds gedurende de zuiveringsgang traden zulke groote verliezen op, dat aan destilleeren niet te denken viel.

In totaal waren dus 400 kg gist opgewerkt zonder tastbaar resultaat.

Na de ontdekking van hetero-auxine werd het probleem belangrijk vereenvoudigd. Hetero-auxine bleek een activiteit te bezitten van 25 milliard AE/g, dus de helft van de activiteit van auxine-a. Wij konden daarom nu volstaan met een millioenvoudige concentreering, d.w.z. de hoeveelheid uitgangsmateriaal kon tot op de helft worden verminderd. Wij hebben dus nogmaals het plasmolysesap van 50 kg gist met een gemiddelde activiteit van 20 millioen AE/kg opgewerkt. De cijfers hiervoor luiden:

	Gewicht van de actieve fractie in mg:	Activiteit in AE/mg:	Totaal aanwezig auxine in mg:
1. plasmolysesap . . . . .	—	20	40
2. aetherextract . . . . .	—	niet getest	—
3. bicarbonaatextract . . . . .	6 500	210 000	26
4. residu na uitkoken met petroleumaether . . . . .	3 000	250 000	25
5. benzolextract . . . . .	—	niet getest	—



Alvorens nu over te gaan tot de bereiding van het Pb- en het Ca-zout, hebben wij een behandeling met xylol ingeschakeld; het stroopje werd met versch gedestilleerde xylol gedurende een half uur in een waterbad op 85° C. verwarmd (badtemperatuur), waarna wij lieten afkoelen en de xylol afschonken. Dit proces werd zoolang herhaald — 8 malen in totaal — tot de afgeschonken xylol kleurloos was. De verzamelde extracten werden in vacuo drooggedampt. Het residu kristalliseerde na een nacht staan bij 1° C. gedeeltelijk uit. De kristallen, die met FeCl<sub>3</sub> en HCl een sterk positieve kleurreactie gaven, werden afgezogen, omgekristalliseerd uit chloroform, twee malen uitgekookt met ligroïne en nog twee malen uit water omgekristalliseerd. Opbrengst 9 mg. Helaas verongelukte hiervan een groot gedeelte en kon de rest slechts in verontreinigde toestand teruggewonnen worden. Zij werd opgenomen in aether, met bicarbonaatoplossing gefractioneerd, waarna de zuur-fractie nog twee malen uit water omgekristalliseerd werd. Smeltpunt 164—165° C. Activiteit 30.000 000 000 AE/g. Mengsmeltpunt met synthetisch  $\beta$ -indolyl-azijnzuur zonder depressie eveneens bij 164—165° C.

## 2. Het auxine uit schimmelcultures.

Wij hebben *Aspergillus niger* gedurende 5—7 dagen bij 30° C. op verschillende, door P. Boysen-Jensen<sup>1)</sup> aangegeven voedingsbodems gekweekt. Daarna werd gefiltreerd en de filtraten op hun auxinegehalte onderzocht.

Het auxinegehalte van voedingsbodem VI kon eerst worden aangetoond, nadat het filtraat door indampen in vacuo geconcentreerd was. In het filtraat van voedingsbodem II kon zelfs na 40-voudige concentrering geen auxine worden aangetoond. Ook de mycelia, gegroeid op de voedingsbodems I, II, III, waren auxine-vrij.

<sup>1)</sup> P. Boysen-Jensen, Biochem. Z. 250, 270 (1932).



Voedingsbodem: (berekend op 100 cm <sup>3</sup> oplossing)	Gevonden hoeveelheid auxine:	Volgens Boysen- Jensen:
I. 5 g glucose; 0,25 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O; 0,025 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,025 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 0,025 g KCl; 1 druppel 10 0/0-ig FeCl <sub>3</sub> ; 100 cm <sup>3</sup> 0,2 0/0-ig HCl.	—	—
II. 0,2 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O; 2 g glucose; 0,5 g citroenzuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	—	—
III. 2 g glucose; 0,5 g pepton; 0,5 g citroen- zuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .	53 000 AE/1	d = 2,2 <sup>1)</sup>
IV. 2 g glucose; 0,5 g citroenzuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,04 g tyrosine.	1 250 000 AE/1	niet uitgevoerd
V. 2 g glucose; 0,5 g citroenzuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g tyrosine <sup>2)</sup> .	520 000 AE/1	d = 1,67
VI. 5 g glucose; 0,5 g citroenzuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g asparagine.	18 750 AE/1	d = 0
VII. 2 g glucose; 0,5 g citroenzuur; 0,025 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g leucine.	300 000 AE/1	niet uitgevoerd

### 3. De identificeering van het auxine uit *Aspergillus niger*.

65 Petrischalen van 20 cm doorsnede werden elk gevuld met 100—125 cm<sup>3</sup> van een voedingsbodem verkregen door 20 g ruwe glucose, 5 g citroenzuur, 0,4 g tyrosine en 0,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in een liter water op te lossen. De schalen werden na steriliseeren en afkoelen geënt met *Aspergillus niger* van

<sup>1)</sup> Voor de berekening van het groeistofgehalte vgl. P. Boysen-Jensen, Biochem. Z. 236, 206 (1931) en Biochem. Z. 250, 271 (1932).

<sup>2)</sup> Aangezien de oplosbaarheid van tyrosine slechts 0,04 g per 100 cm<sup>3</sup> water bedraagt, bevatte deze voedingsbodem de grootste hoeveelheid van het tyrosine als „Bodenkörper“.

Tieghem. Na 6 dagen kweken bij 31° C. werd het mycelium verwijderd en de oplossing gefiltreerd. Het filtraat had een activiteit van 10 000 AE per cm<sup>3</sup>; het werd aangezuurd met geconc. HCl en met aether geëxtraheerd. Het aetherextract werd met een oplossing van bicarbonaat gefractioneerd en de zuurfractie op de gebruikelijke wijze met petroleum-aether uitgekookt. Het zoo verkregen product, met een activiteit van 27 000 000 AE per g, hebben wij voor de identificeeringsproeven gebruikt:

4,5 mg werden 3 uren gekookt met 2,5 cm<sup>3</sup> 5 %-ige HCl, daarna uitgeschud met aether en de na afdampen van de aether verkregen rest getest. Deze rest was inactief.

1 mg werd gedurende 3 uren gekookt met 2,5 cm<sup>3</sup> 5 %-ige KOH. Na afkoelen werd aangezuurd met verd. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en uitgeschud met aether. De aether-rest had een activiteit van 19 000 AE, dus 70 % van de oorspronkelijke activiteit. Waar zowel auxine-a als auxine-b door koken met loog vernietigd worden <sup>1)</sup>, is hun aanwezigheid hier dus uitgesloten en wordt de waarschijnlijkheid, dat wij hier met hetero-auxine te doen hebben zeer groot.

#### 4. De identificeering van het auxine uit *Rhizopus nigricans*.

80 Petrischalen van 20 cm doorsnede werden elk gevuld met 175 cm<sup>3</sup> zand, dat van te voren door herhaaldelijk opslibben in water, gevolgd door verhitten op 300° C., gezuiverd was. In elke schaal deden wij 75 cm<sup>3</sup> gesteriliseerd 10 %-ig moutextract, waarna wij de platen steriliseerden, na afkoelen entten met *Rhizopus nigricans* en 6—7 dagen kweekten bij 25° C. Het zand werd dan uitgeperst en uitgewassen, het verzamelde filtraat — ongeveer 10 l — met geconc. HCl aangezuurd en met aether uitgeschud. Na fractioneeren met bicar-

<sup>1)</sup> Zie pg. 22 van dit proefschrift.

bonaatoplossing en uitkoken van de zuurfractie met petroleumaether, had het product een activiteit van 40 000 000 AE per gram.

3 mg hiervan werden gedurende 3 uren gekookt met 2,5 cm<sup>3</sup> 5 %-ig HCl. Na extractie met aether bleek de aetherrest alle activiteit verloren te hebben.

2 mg werden gedurende 3 uren gekookt met 2 cm<sup>3</sup> 5 %-ige KOH. Na afkoelen, aanzuren en extraheeren met aether bleek de aetherrest een activiteit te bezitten van 64 000 AE, dus 80 % van de oorspronkelijke activiteit.

Ook hier hebben wij dus zeer waarschijnlijk te maken met hetero-auxine.

### 5. Moleculairgewichtsbepalingen.

De bepalingen geschieden volgens de diffusiemethode van F. W. W e n t en werden uitgevoerd door A. J. H a a g e n S m i t. Wij gebruikten bij de gist een gedeelte van het product na de fractioneering met bicarbonaatoplossing, bij *Aspergillus* en *Rhizopus* de boven beschreven extracten. Als moleculairgewicht werd gevonden: voor de groeistof uit gist 193, voor de groeistof uit *Aspergillus*cultures 169 en voor de groeistof uit *Rhizopus*cultures 176 en 190.  $\beta$ -indolyl-azijnzuur heeft een moleculairgewicht 175, dat van auxine-a en auxine-b bedraagt resp. 328 en 310.

### 6. Bepaling van de dissociatieconstanten.

Wij maten <sup>1)</sup> de  $P_H$  van oplossingen van hetero-auxine en auxine-a en vonden de volgende waarden:

hetero-auxine: 0,01	molair oplossing	$P_H = 3,44$
0,005	molair oplossing	$P_H = 3,55$
0,001	molair oplossing	$P_H = 3,92$

<sup>1)</sup> De metingen geschieden met een micro-ionometer van Lautenschläger, aan chinhydron-verzadigde calomel electroden.



auxine-a: 0,001 molair oplossing  $P_H = 4,00$

0,001 molair oplossing  $P_H = 3,99$

Met de formule  $K = \frac{[H^+]^2}{c - [H^+]}$  (massawerkingswet) berekenen wij hieruit de dissociatieconstanten en vonden voor  
 hetero-auxine:  $K = 1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  en  $2 \times 10^{-5}$   
 auxine-a:  $K = 1 \times 10^{-5}$  en  $1 \times 10^{-5}$ .

## 7. Synthetische producten.

### 1) $\beta$ -indolyl-azijnzuur (XV).

Het  $\beta$ -indolyl-azijnzuur werd bereid volgens de methode van R. M a j i m a en M. K o t a k e<sup>1)</sup>, door op indolmagnesiumjodide chlooracetonitril te laten inwerken en het gevormde product te verzeepen. Kleurlooze kristallen (uit benzol). Smp. 164—165° C.<sup>2)</sup>. Activiteit: 25 milliard AE/g.

### 2) $\beta$ -indolyl-azijnzure methylester (XVI).<sup>3)</sup>

100 mg  $\beta$ -indolyl-azijnzuur werden opgelost in 5 cm<sup>3</sup> absolute aether. Deze oplossing koelden wij met ijs en voegden er een oplossing van diazomethaan in aether aan toe. Het diazomethaan was op de gebruikelijke wijze uit nitroso-methylurethaan en KOH bereid. Na drie uren staan bij kamertemperatuur dampen wij de oplossing droog om het diazomethaan kwijt te raken en namen de rest weer in aether op. Deze oplossing werd gefiltreerd, twee malen met 3 %-ige

<sup>1)</sup> R. M a j i m a en M. K o t a k e, Ber. 58, 2042 (1925).

<sup>2)</sup> Alle in dit proefschrift aangegeven smeltpunten zijn ongecorrigeerd.

<sup>3)</sup> R. J a c k s o n, J. of Biol. Chem. 88, 660 (1930), heeft zoowel de methyl- als de aethylester bereid door inwerking van methanol-(aethanol-) chloorwaterstof op  $\beta$ -indolyl-azijnzuur. Hij stelt zich tevreden met de vermelding, dat beide esters bij ongeveer 180° C. bij 2 mm druk destilleeren en geeft geen analyses.



bicarbonaatoplossing uitgeschud en eenmaal met water uitgewasschen. De aether werd daarna boven  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogd en afgedampt. Er resulteerde een olie met een activiteit van 10 milliard AE/g. De olie werd opgelost in weinig alcohol en aan deze oplossing toegevoegd een warm verzadigde oplossing van 150 mg pikrinezuur in alcohol. Bij afkoelen kristalliseerde het pikraat uit, dat nog twee malen uit alcohol werd omgekristalliseerd. Roode kristallen. Smp.  $125^\circ \text{C}$ .

C-H-N-analyse<sup>1)</sup> der stof na drogen bij  $50^\circ \text{C}$ . in hoogvacuum boven  $\text{P}_2\text{O}_5$ :

3,598 mg stof gaven 6,460 mg  $\text{CO}_2$  en 1,070 mg  $\text{H}_2\text{O}$ ;

3,411 mg stof gaven  $0,526 \text{ cm}^3 \text{ N}_2$  bij  $23^\circ \text{C}$ . en 755 mm.

Berekend voor  $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_9\text{N}_4$  (418,1): C 48,79 %; H 3,37 %; N 13,39 %.

Gevonden . . . . . : C 48,97 %; H 3,33 %; N 13,46 %.

5 mg van dit pikraat werden onder verwarming op een waterbad in  $25 \text{ cm}^3$  water opgelost en met wol ontleed<sup>2)</sup>. De teruggewonnen vrije ester had eveneens een activiteit van 10 milliard AE/g.

### 3) $\beta$ -indolyl-azijnzure aethylester (XVII).

Deze werd bereid door inwerking van diazoaethaan op  $\beta$ -indolyl-azijnzuur. Het is een lichtgele olie met een activiteit van 3 milliard AE/g. Ook hiervan werd in alcoholisch milieu een pikraat bereid. Roode kristallen. Smp.  $84^\circ \text{C}$ ., na drie malen omkristalliseeren uit alcohol.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij kamertemperatuur in hoogvacuum boven  $\text{P}_2\text{O}_5$ :

5,034 mg stof gaven 9,265 mg  $\text{CO}_2$  en 1,740 mg  $\text{H}_2\text{O}$ ;

2,942 mg stof gaven  $0,336 \text{ cm}^3 \text{ N}_2$  bij  $25^\circ \text{C}$ . en 747 mm.

<sup>1)</sup> De analyses werden uitgevoerd door Dr. Ing. A. Schoeller, Berlijn-Schmargendorf.

<sup>2)</sup> H. Müller, H.S. 207, 209 (1932). Alle pikraten, die wij hebben bereid, zijn op deze wijze getest.

Berekend voor  $C_{18}H_{16}O_9N_4$  (432,2): C 49,98 %; H 3,73 %; N 12,96 %.  
 Gevonden . . . . . : C 50,20 %; H 3,87 %; N 12,86 %.

#### 4) $\beta$ indolyl-azijnzure propylester (XVIII).

Deze nog onbekende ester ontstond door inwerking van diazopropan 3) op  $\beta$ -indolyl-azijnzuur. Het is een gele olie met een activiteit van 1 milliard AE/g. Het pikraat (uit alcohol) smelt bij  $105^\circ$  C. In totaal werd 3 malen omgekristalliseerd.

C-H-N-analyse van het pikraat na drogen bij kamertemperatuur in hoogvacuum boven  $P_2O_5$ :

4,519 mg stof gaven 8,515 mg  $CO_2$  en 1,590 mg  $H_2O$ ;

3,151 mg stof gaven  $0,351\text{ cm}^3$   $N_2$  bij  $23,5^\circ$  C. en 752 mm.

Berekend voor  $C_{19}H_{18}O_9N_4$  (446,2): C 51,10 %; H 4,06 %; N 12,56 %.

Gevonden . . . . . : C 51,39 %; H 3,94 %; N 12,65 %.

#### 5) $\beta$ -indolyl-azijnzure isopropylester (XIX).

Ook deze ester was in de literatuur onbekend. Wij hebben hem als volgt bereid:

200 mg  $\beta$ -indolyl-azijnzuur werden opgelost in alcohol en met een oplossing van KOH in alcohol zorgvuldig geneutraliseerd onder toevoegen van wat water om het kaliumzout in oplossing te houden. Daarna voegden wij een kleine overmaat  $AgNO_3$  in water opgelost toe en filtreerden het gevormde Ag-zout af. Dit Ag-zout werd goed uitgewasschen met alcohol en bij kamertemperatuur in het donker en in vacuo gedroogd boven  $P_2O_5$ . Af en toe werd het drogen onderbroken en het zout gepoederd. Het stofdroge Ag-zout slibden wij op in absolute benzol, voegden er iets meer dan de berekende hoe-

1) Volgens S. Nirdlinger en S. Acree, Am. Chem. Journ. 43, 358 (1910) bereidden wij nitroso-propylurethaan door  $N_2O_3$  op het condensatieproduct van propylamine en chloorkoolzure ester te laten inwerken. Uit het nitroso-propylurethaan verkregen wij op de gebruikelijke wijze het diazopropan.

veelheid isopropyljodide aan toe en schudden het mengsel gedurende 6 uren in het donker. Daarna werd afgefiltreerd en de benzol in vacuo verjaagd. Het residu namen wij op in aether en schudden deze aether drie malen met 5 %-ige bicarbonaatoplossing uit. De aether werd toen gedroogd boven  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en afgedampt. Het residu had een activiteit van 100 miljoen AE/g. Van dit residu werd een pikraat bereid. Roode kristallen uit alcohol. Smp.  $100-101^\circ \text{C}$ ., na drie malen omkristalliseeren.

C-H-N-analyse van het pikraat na drogen bij kamertemperatuur in hoogvacuum boven  $\text{P}_2\text{O}_5$ :

4,318 mg stof gaven 8,094 mg  $\text{CO}_2$  en 1,532 mg  $\text{H}_2\text{O}$ ;

3,874 mg stof gaven 0,413  $\text{cm}^3$   $\text{N}_2$  bij  $23^\circ \text{C}$ . en 768 mm.

Berekend voor  $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_9\text{N}_4$  (446,2): C 51,10%; H 4,06%; N 12,56%.

Gevonden . . . . . : C 51,12%; H 3,97%; N 12,42%.

#### 6) 2,3-dihydro-indol-3-azijnzure methylester (XX).

Deze tot nu toe nog niet beschreven ester hebben wij als volgt verkregen:

100 mg  $\beta$ -indolyl-azijnzure methylester werden opgelost in 7,5  $\text{cm}^3$  alcohol en aan deze oplossing toegevoegd 30 mg  $\text{PtO}_2$  en 0,1  $\text{cm}^3$  geconc.  $\text{HCl}$ . In drie uren tijd werden — onder schudden bij kamertemperatuur — opgenomen 16,12  $\text{cm}^3$   $\text{H}_2$  (berekend 11,85  $\text{cm}^3$ )<sup>1)</sup>. Het hydreeen werd toen onderbroken en de katalysator afgefiltreerd. Het filtraat werd tot op een klein volumen ingedampt, met een 10 %-ige oplossing van kaliloog zwak alkalisch gemaakt en met aether geëxtraheerd. Dit aetherextract schudden wij herhaalde malen uit met  $\frac{1}{2}$  %-ig zwavelzuur. Uit het waterextract konden wij na opwerken 27 mg van het uitgangsmateriaal als pikraat terugwinnen. Het zure extract neutraliseerden wij met 0,2 n  $\text{KOH}$  en extraheerden het met aether. Het aetherextract werd

<sup>1)</sup> Beide volumina zijn gereduceerd op  $0^\circ \text{C}$ . en 760 mm.



boven  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gedroogd en afgedampt. Het residu losten wij in weinig alcohol op en voegden er een warm verzadigde oplossing van pikrinezuur in alcohol aan toe. In de koude kristalliseerden roode naaldjes uit, die afgezogen en nog vier malen uit alcohol omgekristalliseerd werden. Smp.  $178^\circ \text{C}$ .

C-H-N-analyse der stof na drogen bij  $50^\circ \text{C}$ . in hoogvacuum boven  $\text{P}_2\text{O}_5$ :

4,490 mg stof gaven 7,995 mg  $\text{CO}_2$  en 1,540 mg  $\text{H}_2\text{O}$ ;

3,883 mg stof gaven  $0,454 \text{ cm}^3 \text{ N}_2$  bij  $26^\circ \text{C}$ . en 760 mm.

Berekend voor  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_9\text{N}_4$  (420,2): C 48,55 %; H 3,83 %; N 13,33 %.

Gevonden . . . . . : C 48,56 %; H 3,84 %; N 13,38 %.

4 mg van dit pikraat werden opgelost in water en met wol ontleed. Het na extractie met aether verkregen residu had nog een activiteit van  $34\ 000\ 000 \text{ AE/g}$ . Wij hebben daarop de methylester als volgt gezuiverd: 100 mg pikraat werden opgelost in water en met wol ontleed. Daarna werd geëxtraheerd met aether en de aether herhaalde malen met  $\frac{1}{2} \%$ -ig zwavelzuur uitgeschud. Dit extract neutraliseerden wij met 0,2 n KOH en schudden het met aether uit. De aether werd gedroogd boven  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en afgedampt. Van het residu bereidden wij weer een pikraat, dat vier malen uit alcohol omgekristalliseerd werd. Het aldus gezuiverde pikraat losten wij weer op in water en ontleedden het met wol. De oplossing werd gebracht op een volumen van  $100 \text{ cm}^3$ . Deze oplossing vertoonde bij de test geenerlei activiteit meer. Ook het na extractie met aether en droogdampen van de aether verkregen residu was onwerkzaam.

#### 7) 2,3-dihydro-indolyl-azijnzuur (XXI).

Vrij  $\beta$ -indolyl-azijnzuur nam bij de katalytische hydreeing met  $\text{PtO}_2$  veel te veel waterstof op. Daarom bereidden wij eerst de 2,3-dihydroindol-3-azijnzure methylester (zie hier-



boven) en zetten deze door verzeeping om in het vrije dihydrozuur, dat in de literatuur nog niet bekend was.

125 mg 2,3-dihydro-indol-3-azijnzure methylester werden gedurende 4 uren op een waterbad aan een terugvloeikoeler verhit met 1 cm<sup>3</sup> 2 n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Daarna voegden wij de berekende hoeveelheid 0,05 n Ba(OH)<sub>2</sub> toe, centrifugeerden het BaSO<sub>4</sub> af en dampten het centrifugaat in vacuo droog. Er resulteerde een dikke gele olie. Deze namen wij in weinig water op en voegden er een warm verzadigde oplossing van 150 mg pikrinezuur in water aan toe. Bij afkoelen sloeg een donkerbruine olie neer, die na 8 weken staan bij 1° C. kristalliseerde. De kristallen werden opgenomen in weinig warme alcohol, uit welke oplossing na drie dagen staan bij kamertemperatuur andermaal een gedeelte uitkristalliseerde. Bij een hernieuwd omkristalliseeren uit alcohol trad spontaan kristallisatie in. Wij kristalliseerden nog twee malen uit alcohol om en verkregen 50 mg roodbruine kristallen met een smeltpunt van 168° C.

Een gedeelte van dit pikraat werd in water opgelost en met wol ontleed. Wij schudden de vloeistof uit met aether en dampten dit aetherextract vervolgens droog. Het residu vertoonde geenerlei activiteit.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij 50° C. in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

4,418 mg stof gaven 7,680 mg CO<sub>2</sub> en 1,400 mg H<sub>2</sub>O;

3,142 mg stof gaven 0,393 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 24° C. en 749 mm.

Berekend voor C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>9</sub>N<sub>4</sub> (406,1): C 47,28 %; H 3,47 %; N 13,79 %.

Gevonden . . . . . : C 47,41 %; H 3,55 %; N 14,17 %.

### 8) 1-methylindol-3-azijnzuur (XXII).

Volgens E. Fischer<sup>1)</sup> werd bereid 1-methylindol-2-carbonzuur door het methylphenylhydrazon van pyrodruiven-

<sup>1)</sup> E. Fischer, Ber. 17, 562 (1884).

zuur in HCl op te lossen. Door decarboxyleeren ontstond hieruit 1-methylindol, dat volgens A. Piccinini<sup>1)</sup> met diazo-azijnester gekoppeld werd. Door verzeeping van het condensatieproduct ontstond 1-methylindol-3-azijnzuur, dat in totaal 8 malen uit benzol-petr.-aether werd omgekristalliseerd. Kleurlooze kristallen, Smp. 128° C. Activiteit: 30 miljoen AE/g. Naderhand hebben wij dit zuur ook nog bereid door het as.-methylphenylhydrazon van aldehydo-propionzure ester met H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> te behandelen overeenkomstig de bereiding van 2-aethylindol-3-azijnzuur (XXV).

#### 9) 2-methylindol-3-azijnzuur (XXIII).

Dit zuur werd verkregen door volgens E. Fischer<sup>2)</sup> het phenylhydrazon van laevulinezuur met ZnCl<sub>2</sub> te smelten. Kleurlooze kristallen na vier malen omkristalliseeren uit acetone. Smp. 128° C. Activiteit: 125 miljoen AE/g.

#### 10) 2-methylindol-3-azijnzure methylester (XXIV).

Deze nog niet beschreven ester werd verkregen door methyleeren van het vrije zuur met diazomethaan. Zij werd drie malen omgekristalliseerd uit verdunde alcohol. Kleurlooze kristallen. Smp. 65° C. Inactief.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij kamertemperatuur in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

4,671 mg stof gaven 12,115 mg CO<sub>2</sub> en 2,740 mg H<sub>2</sub>O;

3,572 mg stof gaven 0,216 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 23° C. en 755 mm.

Berekend voor C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N (203,1): C 70,90 %; H 6,45 %; N 6,89 %.

Gevonden . . . . . : C 70,75 %; H 6,56 %; N 6,93 %.

#### 11) 2-aethylindol-3-azijnzuur (XXV).

Dit tot nog toe niet beschreven zuur verkregen wij

<sup>1)</sup> A. Piccinini, R.A.L. 5 8<sup>1</sup>, 315 (1899).

<sup>2)</sup> E. Fischer, Ann. 236, 146 (1886).

door 1 g homo-laevulinezuur met de berekende hoeveelheid phenylhydrazine te overgieten en het condensatieproduct met 20 cm<sup>3</sup> absolute alcohol, waaraan 1,6 g geconc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was toegevoegd, gedurende 4 uren op een waterbad aan een terugvloeikoeler te koken. Na afkoelen werd het reactieproduct in 500 cm<sup>3</sup> water uitgegoten, waarop zich een bruine olie afscheidde, die door uitschudden met aether en afdampen van de aether kon worden afgezonderd. Deze olie werd met 50 cm<sup>3</sup> van een 10 %-ige oplossing van KOH in alcohol gedurende  $\frac{3}{4}$  uur op een waterbad gekookt. Het reactieproduct gaten wij wederom uit in water en extraheerden deze oplossing, nadat zij met verdund H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aangezuurd was, met aether. De aether werd met een bicarbonaatoplossing gefractioneerd. De zuurfractie leverde na opwerken een kristallijn product, dat 6 malen uit water werd omgekristalliseerd, waarbij groote verliezen optraden. Kleurloze kristallen. Smp. 100—101 ° C. Inactief.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij kamertemperatuur in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

4,928 stof gaven 12,835 mg CO<sub>2</sub> en 2,880 mg H<sub>2</sub>O;

3,462 mg stof gaven 0,215 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 20,5° C. en 764 mm.

Berekend voor C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N (203,1): C 70,90 %; H 6,45 %; N 6,89 %.

Gevonden . . . . . : C 71,03 %; H 6,54 %; N 7,13 %.

## 12) 5-methylindol-3-azijnzuur (XXVI).

5 g ester van barnsteenzuurhalfaldehyde (= formylpropionzuur) <sup>1)</sup> werden op de berekende hoeveelheid p-tolylhydrazine <sup>2)</sup> gegoten en de verkregen bruine stroop behandeld, zooals bij 2-aethylindol-3-azijnzuur (XXV) is beschreven. De kristallen van het tot dusverre onbekende zuur werden 3

<sup>1)</sup> W. Wislicenus, E. Böklen en F. Reuthe Ann. 363, 353 (1908).

<sup>2)</sup> betrokken van Fraenkel en Landau, Qualiteit „reinst, zur Analyse“.



malen uit water omgekristalliseerd. Zeer licht gele kristallen. Smp. 151° C. Activiteit 1,5 milliard AE/g.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij 30° C. in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

4,242 mg stof gaven 10,840 mg CO<sub>2</sub> en 2,290 mg H<sub>2</sub>O;

2,627 mg stof gaven 0,176 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 23° C. en 749 mm.

Berekend voor C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>N (189,1): C 69,80%; H 5,87%; N 7,49%.

Gevonden . . . . . : C 69,69%; H 6,04%; N 7,61%.

### 13) 5-methylindol-3-azijnzure methylester (XXVII).

Ook deze nog niet beschreven ester werd verkregen door inwerking van diozameethaan op het vrije zuur. Het was een olie met een activiteit van 1 200 000 000 AE/g. Het pikraat (uit alcohol) smolt bij 122-123° C., na 4 malen omkristalliseeren.

N-analyse der stof na drogen bij 30° C. in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

2,710 mg gaven 0,302 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 23° C. en 768 mm.

Berekend voor C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>O<sub>4</sub> (432,2): N 12,96%.

Gevonden . . . . . : N 13,00%.

### 14) 2,5-dimethylindol-3-azijnzuur (XXVIII).

7,5 g laevulinezuur werden opgelost in water en gevoegd bij de zwak azijnzure oplossing van de berekende hoeveelheid p-tolyldiazine. Het ontstane p-tolyldiazon werd afgefiltreerd, uitgewasschen met water, gedroogd bij kamertemperatuur in vacuo boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en drie malen uit benzol omgekristalliseerd. Kleurlooze kristallen, die aan de lucht snel verharsen. Smp. 97° C.

7,5 g van dit p-tolyldiazon werden innig gemengd met 37,5 g ZnCl<sub>2</sub> en in een open kolf in een oliebad verhit tot 120° C. (buitenbad), waarop het mengsel een half uur werd gehouden. De groene smelt werd na afkoelen behandeld met 0,2 n HCl om het ZnCl<sub>2</sub> op te lossen, waarna werd gefiltreerd. Het donkere, kleverige residu droogden wij bij kamer-



temperatuur aan de lucht, poederden het en kookten het herhaaldelijk met aether uit. De aether werd met een bicarbonaatoplossing gefractioneerd. De zuur-fractie leverde na opwerken een grijswit poeder, dat in verdund azijnzuur werd opgenomen. De oplossing werd opgekookt met noriet en warm gefiltreerd. Het bij afkoelen uitkristalliseerende gedeelte werd nog drie malen uit verdund azijnzuur omgekristalliseerd. Zeer licht gele kristallen. Smp. 172—173° C. Inactief. Het zuur was in de literatuur nog niet bekend.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij 60° C. in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

2,701 mg stof gaven 7,040 mg CO<sub>2</sub> en 1,570 mg H<sub>2</sub>O;

3,317 mg stof gaven 0,218 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 25° C. en 749 mm.

Berekend voor C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N (203,1): C 70,90%; H 6,45%; N 6,89%.

Gevonden . . . . . : C 71,09%; H 6,50%; N 7,42%.

### 15) $\alpha$ -( $\beta$ -indolyl)-propionzuur (XXIX).

Door ringsluiting en afsplitsing van ammoniak aan het phenylhydrazon van aldehydo-isoboterzuur volgens A. Ellinger<sup>1)</sup> kregen wij het verlangde zuur in handen. Kleurlooze kristallen na 3 malen omkristalliseeren uit water. Smp. 102° C. (A. Ellinger geeft 107° C. aan). Activiteit: 5 milliard AE/g.

Daar dit omkristalliseeren met groote verliezen gepaard ging, hebben wij het pikraat bereid en dit vier malen uit alcohol omgekristalliseerd. Na ontleding van het pikraat met wol vonden wij voor het residu eveneens een activiteit van 5 milliard AE/g.

C-H-N-analyse van het pikraat na drogen der stof bij 30° C. in hoogvacuum boven P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:

5,051 mg stof gaven 9,040 mg CO<sub>2</sub> en 1,560 mg H<sub>2</sub>O;

3,198 mg stof gaven 0,372 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 23,5° C. en 757 mm.

<sup>1)</sup> A. Ellinger, Ber. 38, 2887 (1905).

Berekend voor  $C_{17}H_{14}O_9N_4$  (418,1): C 48,79 %; H 3,37 %; N 13,39 %.  
 Gevonden . . . . . : C 48,81 %; H 3,48 %; N 13,34 %.

Het pikraat smolt bij 146—147° C.

16)  $\beta$ -indolyl-carbonzuur (XXX).

Wij lieten volgens R. Majima en M. Kotake<sup>1)</sup> chloormierenzure aethylester inwerken op indolmagnesiumjodide en kregen door verzeeping van het reactieproduct het gewenschte zuur. Kleurlooze kristallen, Smp. 213° C. Inactief.

17)  $\beta$ -indolyl-3-propionzuur (XXXI).

Dit werd bereid:

a) analoog aan indol-3-azijnzuur volgens R. Majima en M. Kotake<sup>2)</sup> waarbij wij chloorpropionitril in plaats van chlooracetonitril gebruikten.

b) volgens A. Ellinger<sup>3)</sup> analoog aan de bereiding van  $\alpha$ -( $\beta$ -indolyl)-propionzuur, waarbij i.p.v. aldehydo-isoboterzuur het aldehydo-boterzuur gebruikt werd.

Kleurlooze kristallen. Smp. 134° C. Inactief.

18)  $\alpha$ -indolyl-carbonzuur (XXXII).

Dit zuur werd verkregen volgens E. Fischer<sup>1)</sup> door verhitten van het phenylhydrazon van pyrodruivenzuur met  $ZnCl_2$  op 195° C. Kleurlooze kristallen. Smp. 200—201° C. Inactief.

<sup>1)</sup> R. Majima en M. Kotake, Ber. 55, 3870 (1922); 63, 2240 (1930).

<sup>2)</sup> R. Majima en M. Kotake, Ber. 58, 2042 (1925).

<sup>3)</sup> A. Ellinger, Ber. 38, 2887 (1905).

<sup>4)</sup> E. Fischer, Ann. 236, 142 (1886).

19)  $\beta$ -indolyl-melkzuur (XXXIII).

*Oidium lactis* werd volgens F. Ehrlich en P. Jacobsen<sup>1)</sup> gekweekt op een voedingsbodem, die *l*-tryptophaan bevatte. Dit *l*-tryptophaan werd zodoende omgezet in *l*- $\beta$ -indolyl-melkzuur. Noch het *l*-melkzuur, noch het racemaat<sup>2)</sup> waren werkzaam. Kleurlooze kristallen na drie malen omkristalliseeren uit aether-ligroïne. Smp. 99° C. voor het *l*-melkzuur en 145—146° C. voor het racemaat.

20)  $\beta$ -indolyl-pyrodruivenzuur (XXXIV).

Dit zuur hebben wij verkregen volgens A. Ellinger en Z. Matsuo<sup>3)</sup> uit het acetyl-azlacton van hippuurzuur en indol-3-aldehyde. Wij hadden na 4 malen omkristalliseeren uit ijsazijn een bijna kleurloos praeparaat in handen met een smp. 210° C. Activiteit: 200 miljoen AE/g.

C-H-N-analyse der stof na drogen bij 100° C. in hoogvacuum boven KOH:

2,282 mg stof gaven 5,475 mg CO<sub>2</sub> en 0,890 mg H<sub>2</sub>O;

4,087 mg stof gaven 9,795 mg CO<sub>2</sub> en 1,630 mg H<sub>2</sub>O;

3,366 mg stof gaven 0,209 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 24° C. en 749 mm;

2,476 mg stof gaven 0,157 cm<sup>3</sup> N<sub>2</sub> bij 24,5° C. en 742 mm.

Berekend voor C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N (203,1): C 64,99 %; H 4,48 %; N 6,89 %.

Gevonden . . . . . : C 65,39 %; H 4,36 %; N 7,03 %.

. . . . . : C 65,36 %; H 4,46 %; N 7,09 %.

Gehalte aan kristal-azijnzuur: berekend: 22,80 %.

gevonden: 22,51 %.

1) F. Ehrlich en P. Jacobsen, Ber. 44, 888 (1911).

2) K. Ichihara en N. Iwakura, H.S. 195, 202 (1931).

3) A. Ellinger en Z. Matsuo, H.S. 109, 261 (1920).



## AANHANGSEL

In verband met de in het Eerste Hoofdstuk besproken onderzoeken hebben wij enkele urine- en faeces-soorten getest en een aantal plantaardige oliën en vetten op hun auxine-gehalte onderzocht. De onderstaande tabellen geven een overzicht van de verkregen resultaten.

Urine van:	s.g.	hoeveelheid uitgescheiden auxine per dag:
mensch . . . . .	1,0265	100 000 000 AE
merrie . . . . .	1,030	30 000 000 ..
merrie . . . . .	1,038	250 000 000 ..
hengst . . . . .	1,034	95 000 000 ..
koe . . . . .	1,043	14 000 000 ..
teef . . . . .	1,0225	4 000 000 ..

Faeces van:	activiteit per gram:
mensch . . . . .	5—10 AE
kip . . . . .	10—15 AE

Oliesoort:	activiteit per kilogram:
slaolie . . . . .	400 000 000 AE
slaolie . . . . .	0 ..
raapolie . . . . .	0 ..
arachisolie . . . . .	0 ..
sesamolie . . . . .	0 ..
ricinusolie . . . . .	0 ..
zonnebloempittenolie . . . . .	0 ..
olijfolie . . . . .	0 ..
cocosvet . . . . .	0 ..

Grondstof:	gewicht van het alcholeextract:	activiteit per kilogram grondstof:
200 g tarwebloem . . . . .	3 g	1 200 000 AE
100 g tarwegrind . . . . .	4 g	7 000 000 "
45 g maïs . . . . .	4 g	4 000 000 "
100 g aardnoten . . . . .	44 g	1 200 000 "
100 g aardnotenschillen . . . . .	2,5 g	0 "
100 g gepelde zonnebloempitten	20 g	0 "
100 g hazelnoten . . . . .	44 g	0 "
160 g hazelnotenschillen . . . . .	2,5 g	0 "
100 g witte boonen . . . . .	5 g	0 "
100 g lijnzaad . . . . .	22 g	0 "

## INHOUD

	Bladz.
<b>THEORETISCH GEDEELTE . . . . .</b>	<b>1</b>
EERSTE HOOFDSTUK.	
<b>De isoleering en het chemisch onderzoek van de</b>	
<b>drie auxinen . . . . .</b>	<b>1</b>
1. Inleiding . . . . .	1
2. De isoleering van auxine-a en auxine-b . . . . .	2
3. De structuurbepaling van auxine-a en auxine-b . . . . .	6
4. De ontdekking van hetero-auxine . . . . .	12
TWEEDE HOOFDSTUK.	
<b>Auxinen uit lagere plantaardige organismen . . . . .</b>	<b>16</b>
1. De isoleering van het auxine uit gist . . . . .	16
2. De identificeering van de auxinen uit <i>Aspergillus niger</i> en <i>Rhizopus nigricans</i> . . . . .	22
DERDE HOOFDSTUK.	
<b>De specificiteit van hetero-auxine . . . . .</b>	<b>27</b>
1. De beteekenis van de carboxylgroep . . . . .	29
2. De beteekenis van de dubbele binding . . . . .	32
3. Het onderzoek van kern-homologen . . . . .	34
4. De beteekenis van de zijketen . . . . .	38
5. Biologische afbraakproducten van tryptophaan . . . . .	40
<b>Slotbeschouwingen . . . . .</b>	<b>43</b>
<b>EXPERIMENTEEL GEDEELTE . . . . .</b>	<b>46</b>
1. De isoleering van het auxine uit gist . . . . .	46
2. Het auxine uit schimmelcultures . . . . .	52
3. De identificeering van het auxine uit <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	53
4. De identificeering van het auxine uit <i>Rhizopus nigricans</i> . . . . .	54
5. Moleculairgewichtsbepalingen . . . . .	55
6. Bepaling van de dissociatieconstanten . . . . .	55
7. Synthetische producten . . . . .	56
<b>Aanhangsel . . . . .</b>	<b>68</b>



# STELLINGEN

## I.

De physiologische activiteit van de drie auxinen is gebonden aan de aanwezigheid van een vrije carboxylgroep.

## II.

De methode om dissociatieconstanten te bepalen door middel van uitschudreacties verdient geen aanbeveling.

K. Thimann en H. Dolk, Proc. Nat. Acad. Science **18**, 30 (1932).

J. Robertson, South African J. of Science **30**, 187 (1933).

## III.

Koper en bismuth hebben een overgangspunt.

J. Hedvall, R. Hedin en E. Andersson, Z.f. anorg. Chem. **212**, 84 (1933).

## IV.

De theorie van W. Lepeschkin is niet in staat de verschijnselen, die bij het verstijfselen van zetmelen optreden, afdoende te verklaren.

W. Lepeschkin, Koll. Z. **70**, 312 (1935).

## V.

Het bewijs, dat *Streptococcus lactis* en *Streptococcus faecalis* als twee verschillende organismen opgevat moeten worden, is door het onderzoek van J. Sherman en P. Stark niet geleverd.

J. Sherman en P. Stark, J. of Dairy Sci. **17**, 525 (1935).

## VI.

De esterase-modellen van W. Langenbeck en J. Baltes zijn aan bedenkingen onderhevig.

W. Langenbeck en J. Baltes, Ber. 67, 387 (1934).

S. Olivier, Rec. 54, 322 (1935).

## VII.

De aanwezigheid van een inosiet-oxydeerend systeem is door het werk van N. Das en B. Guha niet bewezen.

N. Das en B. Guha, H.S. 235, 157 (1935).















U

19