



Ademhaling, gisting en groei : een onderzoek over de werking van auxinen en van biotine

<https://hdl.handle.net/1874/322565>

Aug. 192, 1936

ADEMHALING, GISTING EN GROEI

EEN ONDERZOEK OVER
DE WERKING VAN AUXINEN EN
VAN BIOTINE

C. J. van Hulssen

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

ADEMHALING, GISTING EN GROEI
EEN ONDERZOEK OVER DE WERKING
VAN AUXINEN EN VAN BIOTINE

RIJKSUNIVERSITEIT TE UTRECHT



1778 3725

Diss. Utrecht 1936

ADEMHALING, GISTING EN GROEI

EEN ONDERZOEK OVER DE WERKING
VAN AUXINEN EN VAN BIOTINE

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-
KUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE
UTRECHT OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNI-
FICUS DR. C. W. VOLLGRAFF, HOOGLEERAAR
IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJS-
BEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SENAAAT
DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN
DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
WIS- EN NATUURKUNDE OP MAANDAG 16
MAART 1936, DES NAMIDDAGS TE VIER UUR

DOOR

CAREL JOHANNES VAN HULSSEN
GEBOREN TE UTRECHT

1936

DRUKKERIJ C. HUIG

—

ZAANDAM

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Aan mijn Ouders.

De voltooiing van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid, U, Oud-Hoogleraren, Hoogleraren en Lectoren van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde hartelijk te danken voor mijn wetenschappelijke opleiding.

In het bijzonder dank ik 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. Verder dank ik al mijn collega's, die mij meermalen met raad en daad terzijde stonden, de laboranten, die mij behulpzaam waren en het gezamenlijk personeel van het Organisch-chemisch Laboratorium, waarvan ik steeds alle medewerking ondervond.

INLEIDING

Ademhaling en gisting zijn levensprocessen, welke de noodige energie voor de cellen leveren. Deze fundamenteele processen staan sedert lange tijd in het middelpunt van de belangstelling en vooral in de laatste tien jaren heeft men door onderzoekingen van WARBURG, WIELAND, KEILIN, OPPENHEIMER, KLUYVER over de ademhaling, en door HARDEN, NEUBERG, v. EULER, MEYERHOF, EMDEN, KOSTYTSCHEW en anderen over de gisting, diepere inzichten in het chemisme van deze problemen verkregen. In hoeverre in een speciaal geval de productie van energie door ademhaling of door een gistingsproces tot stand komt is een vraag, waarover men veel gediscussieerd heeft.

PASTEUR heeft zijn opvatting over gisting samengevat met de woorden: „La fermentation est la vie sans air.” Hij dacht aan het alternatief ademhaling óf gisting, met dien verstande, dat de cel in aanwezigheid van zuurstof ademhaalt en in afwezigheid daarvan gist. In tegenstelling daarmee heeft BUCHNER geconstateerd, dat bij gist geen verschil in de intensiteit van de gisting optreedt, indien zuurstof al of niet aanwezig is, een bezwaar, dat PASTEUR niet op overtuigende wijze weerleggen kon. Dat er inderdaad een samenhang bestaat tusschen ademhaling en gisting werd eerst veel later door MEYERHOF (17)¹⁾ aangetoond. Uit een in het jaar 1925 gehouden voordracht van deze auteur moge het volgende, dat ons meteen een duidelijk inzicht in het vraagstuk geeft, aangehaald worden:

„PASTEUR fehlten begrifflicherweise die quantitativen Methoden, die allein eine bestimmte Entscheidung in dieser Frage hätten herbeiführen können. Er brauchte daher eine eigentüm-

¹⁾ De tusschen haakjes geplaatste nummers verwijzen naar een alphabetische litteratuurlijst, welke zich aan het eind van dit proefschrift bevindt.

liche, von seinen Kritikern mit Recht verworfene Argumentation, indem er nicht, wie er hätte tun sollen, die Gärungsgeschwindigkeit einer gegebenen Hefemenge in An- und Abwesenheit von Sauerstoff verglich, sondern vielmehr den Hefezuwachs unter Aufwand einer bestimmten Zuckermenge. Da nun die Hefe in Sauerstoff mit Aufwand einer geringeren Menge Zucker wächst, so drückte er dies so aus, dass die Gärkraft pro Einheit zugewachsener Hefe in Sauerstoff schwächer ist. Aber auch HANS BUCHNER, der auf diese fehlerhafte Argumentation aufmerksam macht, irrte doch seinerseits bei seinem Versuche, PASTEUR zu widerlegen, und zwar hauptsächlich, weil er nicht imstande war, die Atmung der Hefe gleichzeitig mit der Gärung zu messen. Bei der gewöhnlichen Unterhefe der Brauereien, mit der BUCHNER arbeitete, wird nämlich von 100 Mol. Zucker nur 1—2 Mol. veratmet und annähernd 99 Mol. vergoren. Die Atmung ist also im Verhältnis zur Gärung ausserordentlich klein. Daher können wir nur eine geringe Wirkung der Atmung erwarten; diese aber findet sich in der Tat. Pro Molekül veratmeten Sauerstoffs wird in der Zeiteinheit aerob annähernd 1 Zucker-Molekül weniger vergoren als in Stickstoff. Hier schützt also 1 Mol. Sauerstoff, das nur $\frac{1}{6}$ Zucker-Molekül verbrennen kann, ungefähr 1 Zucker-Molekül vor der Spaltung; anders ausgedrückt, werden für jedes oxydierte Zucker-Molekül gegen 6 Mol. an der Vergärung gehindert, während bei der Milchsäure-Bildung für jedes oxydierte Zucker-Molekül 3—6 Mol. vor der Spaltung bewahrt blieben."

PASTEUR heeft bij de hier geciteerde proeven al een poging gedaan ademhaling en gisting in hun relatie met de groei van de gist te beschouwen. Dit leidt ons tot het eigenlijke onderwerp „ademhaling, gisting en groei". Uit de opmerking over ademhaling en gisting blijkt, dat meer dan een halve eeuw noodig was om een dieper inzicht in het verband tusschen deze verschijnselen te verkrijgen. Het spreekt vanzelf, dat het nog

moelijker zal zijn het chemisme van de groei en zijn relatie tot ademhaling en gisting op te helderen. Hier is het onderzoek pas in het beginstadium en uit den aard der zaak kan dit proefschrift alleen een kleine bijdrage tot deze vraagstukken brengen, waarbij wij ons bovendien nog tot de plantaardige groei beperken.

Het is niet overbodig met enkele woorden het begrip groei en de groeifasen van een plantaardige cel nader te definieeren. Volgens F. A. F. C. WENT (22) hebben wij algemeen onder groei te verstaan een irreversibele vergrooting van het volumen van een plant of plantenorgaan. De opvallende volumenvergrooting bij de groei van een hoogere plant berust hoofdzakelijk op celstrekking. Bij de celstrekking hebben belangrijke veranderingen aan de celwanden plaats en wordt water opgenomen, daarentegen hebben wij geen, of bijna geen, toeneming van het protoplasma. De celdeeling heeft op zichzelf geen vergrooting van het volumen tengevolge; pas secundair groeien de dochtercellen tot de grootte van de moedercel, een groeifase, voor welke F. KÖGL (16), samen met verschillende botanici de naam „plasmagroei” voorgesteld heeft. De drie groeifasen van een plantaardige cel zijn dus met celdeeling, plasmagroei en celstrekking aan te duiden; het spreekt vanzelf, dat de tweede en derde fase niet scherp zijn te scheiden en geleidelijk in elkaar kunnen overgaan.

Groei berust op stofwisselingsverschijnselen en de daarmee verband houdende chemische veranderingen konden reeds lang scheikundig bestudeerd worden, daar het hier om stoffen ging, welke in relatief groote hoeveelheden in de plant aanwezig zijn. Daarentegen is men eerst in de laatste jaren iets te weten gekomen over stoffen, welke slechts in uitermate geringe hoeveelheden door de plant geproduceerd worden en welke toch een beslissende rol bij de groei van de plant spelen. Deze stoffen zijn algemeen noodzakelijk om een regelende invloed op de levensverrichtingen van de plant uit te oefenen. Zij toonen een belangrijke overeenkomst met de dierlijke hormonen

en worden op voorstel van F. A. F. C. WENT en F. KÖGL (23) dienovereenkomstig phytohormonen genoemd. Het begrip „phytohormoon” werd later door F. KÖGL (16) nog nader gepreciseerd: het zijn „oligodynamische Stoffe organischer Natur, deren sich der pflanzliche Organismus für den betreffenden physiologischen Effekt *selbst* bedient.” Tot nu toe zijn slechts enkele phytohormonen bekend, en wel auxine-a, auxine-b, alsmede het hetero-auxine, welke hoofdzakelijk de celstrekking bevorderen en verder het biotine, dat bij de plasma-groei (resp. bij de celdeeling) van bepaalde giststrassen werkzaam is. Het leek van tevoren niet onmogelijk, dat deze phytohormonen in de eerste plaats hun werking uitoefenen op ademhaling, resp. gisting en dat langs deze weg het physiologisch effect tot stand komt, dat tot de ontdekking van die phytohormonen geleid heeft. Inderdaad concludeerde J. BONNER (2) in het jaar 1933 uit zijn proeven, dat de auxinen invloed uitoefenden op de ademhaling; in het jaar 1934 kwamen H. v. EULER en H. LARSSON (6) tot de conclusie, dat factor Z, een activator van de gisting, identiek zou zijn met bios II. Tegen deze conclusies was echter het bezwaar te opperen, dat met ruwe praeparaten gewerkt was. In tegenstelling met genoemde auteurs hadden wij in het Utrechtsche Laboratorium het voordeel over de gekristalliseerde phytohormonen te kunnen beschikken; schrijver van deze dissertatie had de taak om na te gaan, of inderdaad ook de zuivere auxinen invloed hebben op de ademhaling en of biotine een activator van het gistingsproces is.

HOOFDSTUK I

Physiologie en chemie der auxinen

a. Testmethode en bereiding

De isoleering van de auxinen in gekristalliseerde toestand, welke aan F. KÖGL en medewerkers in het Organisch-chemisch Laboratorium der Rijks-Universiteit te Utrecht gelukt is, berustte op de door F. W. WENT (24) uitgevonden quantitative testmethode voor „de groeistof”. Deze meetmethode, welke later ook voor ons eigen onderzoek van belang zal blijken, werkt met 3 à 5 dagen oude plantjes van haver (*Avena sativa*).

De groeistof 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 heeft gedurende enkele uren geen groei meer plaats tot langzamerhand de bovenste cellagen de functie van de top overnemen („geregeneerde top”) en opnieuw groeistof gevormd en getransporteerd kan worden. F. W. WENT ontdekte, dat, wanneer men dergelijke afgesneden toppen op een dun plaatje agar-agar plaatste, de groeistof uit de toppen in de agar-agar diffundeerde. Een op deze wijze met groeistof voorzien agarblokje kan de plantentop — althans gedurende enkele uren — vervangen. WENT paste verder de volgende kunstgreep toe: Het agar-agarblokje werd éézijdig op de gedecapiteerde coleoptile geplaatst. De naar beneden getransporteerde groeistof komt nu in de eerste plaats in aanraking met *die* plantencellen, welke zich *onder* het agar-agarblokje bevinden. Het gevolg zal zijn, dat deze cellen zich gaan strekken, niet echter de diametraal daar tegenover liggende cellen; het resultaat is een kromming van de coleoptile. Deze kromming is binnen bepaalde grenzen en onder

bepaalde omstandigheden evenredig met de groeistofconcentratie in het agar-agarblokje.

Om het auxinegehalte van verschillende praeparaten gemakkelijk te kunnen vergelijken werd een eenheid gedefinieerd. Onder een Avena-Eenheid (A.E.) wordt die hoeveelheid groeistof verstaan, welke in een agar-agarblokje van $\frac{1}{600}$ cc aanwezig moet zijn, om bij de test van F. W. WENT aan een gedecapiteerde coleoptile binnen twee uren een kromming van 10° te veroorzaken bij een vochtgehalte van 92 % ¹⁾ en een temperatuur van 22—23° C.; hierbij moeten de uitwendige omstandigheden in de proefkamer nauwkeurig constant worden gehouden (10).

b. *Isolering van auxine-a en -b*

Als uitgangsmateriaal voor de isolering van groeistof werd menselijke urine genomen; er was nl. gebleken, dat deze bron veel meer groeistof bevatte dan de toen bekende plantaardige materialen. De zuivering (10) berustte in eerste instantie op de oplosbaarheid van groeistof in aether en zijn zure eigenschappen. Vervolgens werd het ruwe product geëxtraheerd met verschillende oplosmiddelen, daarna onwerkzame bijproducten als calcium- en loodzouten neergeslagen, en het zoover gezuiverde praeparaat na behandeling met methanol en chloorwaterstof gedestilleerd in hoogvacuum. In de middenfracties scheidden zich kristallen af, welke na verdere zuivering bij 196° C. smolten. De kristallen waren optisch actief en hadden de bruto-formule $C_{18}H_{32}O_5$. Hun werkzaamheid bij de Avena-test bedroeg 50 milliard AE per gram. De nieuwe stof kreeg de naam auxine (van *αὐξάνω* = groeien); later werd voor dit kristallisaat ter onderscheiding van een nauw verwante verbinding de naam auxine-a ingevoerd.

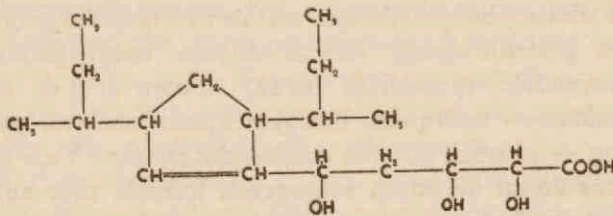
Het gelukte F. KÖGL, A. J. HAAGEN SMIT en H. ERXLEBEN (11) ook uit plantaardige materialen, nl. uit maisolie

¹⁾ Dit vochtgehalte is later tot 87% teruggebracht.

en uit mout, auxine-a te isoleeren; tevens bleek hierin nog een andere werkzame stof aanwezig te zijn. Deze auxine-b genoemde verbinding had de bruto-formule $C_{18}O_{30}O_4$, het smeltpunt was $183^\circ C.$, de activiteit was even groot als die van auxine-a, nl. 50 milliard A.E. per gram. Ook deze kristallen waren optisch actief.

c. De structuurbepaling van auxine-a en -b

F. KÖGL en H. ERXLÉBEN (12) kwamen op grond van hun onderzoekingen tot de volgende formule voor auxine-a:



De redenen, welke tot deze formule geleid hebben, mogen in het volgende kort worden samengevat:

Auxine-a is een zuur, dat in evenwicht is met zijn lacton en wel wordt dit evenwicht zeer snel, in de loop van enkele uren bereikt. Hieruit kan men dus besluiten, dat een carboxylgroep en een hydroxylgroep op de δ -plaats in het molecule aanwezig moeten zijn, terwijl de γ -plaats zeer waarschijnlijk vrij van hydroxyl is. De andere twee zuurstofatomen moeten eveneens alcoholische hydroxylgroepen zijn, daar behandeling van auxine met m-dinitrobenzoylchloride een tri- (m-dinitrobenzoyl)-derivaat geeft. Bij katalytisch hydreeren worden 2 H-atomen opgenomen, waaruit men kan afleiden, dat het molecule maar één dubbele binding heeft en, gezien de samenstelling, dus een koolstofring aanwezig moet zijn.

De dubbele binding bleek voor de oxydatieve afbraak het meest geschikte uitgangspunt te zijn. Wordt auxine-a met kaliumpermanganaat in soda-alkalisch milieu behandeld, dan

ontstaat een optisch actief dicarbonzuur $C_{13}H_{24}O_4$. Dihydro-auxine-a geeft bij oxydatie met chroomzuur in ijsazijn een optisch actief cyclisch keton $C_{13}H_{24}O$. Deze reacties zijn het beste te verklaren door aan te nemen, dat de ring de dubbele binding bevat en dat bovendien bij de afbraak de zuurstofhoudende keten van de ring wordt afgesplitst.

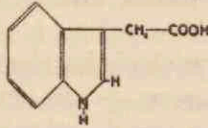
Het C_{13} -dicarbonzuur bleek een $\alpha\alpha'$ -di-(sec. butyl)-glutaarzuur te zijn, daar het bij verdere afbraak een α -methyl-boterzuur en een 3-methylpentanon gaf. Deze beide splitsingsproducten konden door analyse en smeltpunt van de resp. p-phenacylester en het dinitrophenylhydrazon met de synthetische producten worden geïdentificeerd. Het $\alpha\alpha'$ -di-(sec. butyl)-glutaarzuur kon bovendien synthetisch bereid worden (15) en was in elk opzicht — smeltpunt, mengsmeltpunt, analyse, optische draaiing — identiek met het auxine-glutaarzuur. Voor al deze gegevens vormt de boven aangegeven formule voor auxine-a de beste verklaring.

Auxine-b is als een monocyclisch oxy-ketocarbonzuur met één dubbele binding op te vatten (12). Het is heel nauw verwant met auxine-a, waaruit het door eenvoudige waterafsplitsing tusschen de hydroxylgroepen op de α - en β -plaats kan ontstaan.

d. Hetero-auxine

Later werd door F. KÖGL, A. J. HAAGEN SMIT en H. ERXLEBEN (13) nog een andere actieve stof in urine gevonden, welke eveneens bij de havertest werkt. De physiologisch actieve verbinding, welke alleen door absorptie aan calcium-carbonaat volgens TSWETT van de laatste optisch-actieve verontreinigingen gezuiverd kon worden, heeft een bruto-formule van $C_{10}H_9O_2N$ en een werkzaamheid van 25 milliard A.E./g in de Avena-test. De verbinding ontving de naam hetero-auxine om aan te duiden, dat het om een chemisch geheel andere stof ging.

Hetero-auxine bleek identiek te zijn met het reeds lang bekende β -indolylazijnzuur:



Het is volkomen begrijpelijk, dat deze stof als normaal afscheidingsproduct in de urine aangetroffen wordt, daar het een afbraakproduct der tryptophaanhoudende eiwitten is. Het gelukte F. KÖGL en D. KOSTERMANS (14) aan te toonen, dat het bij de havertest werkzame bestanddeel van gistextracten eveneens met β -indolylazijnzuur identiek is.

Ook door verschillende andere schimmels alsmede door bacterieculturen wordt een auxine geproduceerd; zoo bereidde NIELS NIELSEN (18) een groeistofoplossing (Rhizopine) uit *Rhizopus suinus* en *Absidia ramosa*, BOYSEN JENSEN (5) uit *Aspergillus niger*. F. KÖGL en D. KOSTERMANS (14) hebben voor de twee schimmels *Rhizopus nigricans* en *Aspergillus niger* aangetoond, dat de door deze organismen geproduceerde groeistof met hetero-auxine identiek is. Het lijkt dus waarschijnlijk, dat lagere organismen in het algemeen alleen in staat zijn tot vorming van β -indolylazijnzuur, terwijl in de hogere planten tot nu toe uitsluitend auxine-a resp. auxine-b werd gevonden. Hierbij komt auxine gelocaliseerd voor in de toppen der coleoptilen, vanwaar het naar de groeizone getransporteerd wordt — b.v. bij haver en mais —, of men vindt geen „auxinecentrum” en het wordt dan in alle groeiende spruitdeelen geproduceerd zooals bij *Vicia Faba* en de Lupinen.

e. Invloed van de groeistoffen op de plant

De botanische litteratuur over de werking der groeistoffen

op planten heeft in de loop der laatste jaren al een groote omvang gekregen; er moge hier gewezen worden op de samenvattingen van J. BABIČKA (1) en van BOYSEN JENSEN (4), in welke de talrijke publicaties min of meer kritisch worden besproken.

De belangrijkste physiologische eigenschap der auxinen is — zooals reeds beschreven — de bevordering van de celstrekking. De in de top van de coleoptile gevormde groeistof wordt basipetaal geleid en oefent in de groeizone zijn werking op de jonge cellen uit. Talrijke botanische onderzoekers hebben zich met het ingewikkelde mechanisme der celstrekking bezig gehouden. HEYN (9) en SÖDING (19) nemen aan, dat de primaire invloed van de groeistof niet op de elastische rekbaarheid van de celwand (reversibele verandering) uitgeoefend wordt. Of echter primair intussusceptie van nieuwe deeltjes of de plastische rekbaarheid (irreversibele verandering) beïnvloed wordt, hierover zijn beide onderzoekers het niet eens. PFEFFER heeft getracht te bewijzen, dat intussusceptie de primaire oorzaak van de groei is. Ook SÖDING kwam met voorbeelden, welke deze opvatting steunden. Laatst genoemde onderzoeker stelt zich op het standpunt van de micellairtheorie (Nägeli), welke door de onderzoekingen over de bouw van de celwanden in de laatste jaren steeds meer veld won. SÖDING denkt zich tusschen de micellen een visceuze intermicellaire substantie, welke door turgor wordt gerekt, hetwelk genoemde auteur echter van ondergeschikt belang acht. De eigenlijke groei bestaat volgens hem uit het „afzetten” van nieuwe glucose-reeksen aan de micellen. De intermicellaire substantie moet dan van het plasma uit opnieuw met bouwstoffen worden aangevuld. De stofvermeerdering der celwand heeft dan celstrekking tengevolge ¹⁾. Deze veronderstelling lijkt heel plau-

¹⁾ Bij eigen proeven over de chemische samenstelling der haverplantjes hebben wij o.a. ook het gehalte aan glucose bepaald. Daarbij is gebleken, dat dit gehalte gedurende de groei toeneemt:

sibel, hoewel daarmee natuurlijk geen verklaring gegeven is, waar en hoe het auxine zijn invloed uitoefent.

Uit den aard der zaak zijn de onderzoeken over de werking der auxinen en over het mechanisme der celstrekking het meest gevorderd. Maar reeds in het begin van het groeistofonderzoek kon door de verschillende onderzoekers worden aangetoond, dat de auxinen ook andere groeiverschijnselen kunnen beïnvloeden. Zoo zouden bijvoorbeeld de photo- en geotropische krommingen door auxinewerking te verklaren zijn. Bij een éénzijdige belichting zou in hoofdzaak door geremd transport aan de lichtzijde, een verschil in groeistofconcentratie tusschen licht- en schaduwzijde ontstaan. De schaduwkant zou meer auxine krijgen en zich dus sterker strekken, waardoor de plant naar het licht toe groeit (F. W. WENT).

De positieve geotropische krommingen der wortels zouden berusten op een grootere auxineconcentratie aan de onderzijde, veroorzaakt onder invloed van de zwaartekracht. Daar de auxinen op de wortelgroei een remmende werking zouden uitoefenen, zou hiermede de groei „naar beneden” te verklaren zijn (CHOLODNY).

Ook van zuivere auxinen is de remmende invloed op de wortelgroei bekend uit de onderzoeken van F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT (13); reeds zeer kleine concentraties van

Tijd in uren	% glucose (drooggewicht)	
	stengel	wortel
2 × 24	6.52	12.52
3 × 24	25.70	14.32
4 × 24	30.80	19.04

Deze toeneming is dus bijzonder groot gedurende de derde dag van de groeiperiode en wordt daarna langzamerhand weer minder. Ook in de wortels neemt het suikergehalte in de eerste vier dagen toe, al is dan de vermeerdering aanzienlijk minder dan in de stengels.

auxine-a, -b, of hetero-auxine in de voedingsoplossing oefenden een duidelijke werking uit. Gedurende de laatste jaren heeft men ontdekt, dat de functie van de auxinen zich niet beperkt tot de reeds besproken verschijnselen. Er werd nl. aangetoond, dat de auxinen ook voor de wortelvorming verantwoordelijk geacht moeten worden. F. W. WENT (24) kon met gekristalliseerde auxine bij erwten en acalypha wortelvorming verkrijgen. Ook aan internodiën van Tradescantia gelukte het F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT (16) met hetero-auxine en auxine-a in zeer kleine concentraties, wortelvorming te verkrijgen. In deze samenhang zijn o.a. verder op te noemen de door auxine gepromde groei der zijknoppen bij Vicia Faba, de callusvorming aan wondvlakken, welke door celstrekking en celdeeling tot stand komt en de eveneens op celdeeling berustende secundaire diktegroei bij zonnebloemen.

HOOFDSTUK II

Auxinewerking en Ademhaling

Inleiding

Als eerste bestudeerde BOYSEN—JENSEN in 1925 of er een verband tusschen groeistofwerking en ademhaling der planten bestond. Hij vond, dat de ademhaling bij gedecapiteerde en niet gedecapiteerde stengels even groot was. NIELS NIELSEN en HARTELIUS konden eveneens geen inwerking van „rhizopine” op de ademhaling van *Aspergillus niger* aantonen. J. BONNER (2) onderzocht later de invloed van groeistof op haverstengels. Hij bracht stukjes van dit plantenorgaan in groeistofoplossingen en bepaalde de lengtevermeerdering; deze had het sterkst plaats, wanneer de stukjes werden gebracht in een oplossing, welke 10 „units”¹⁾ per cc bevatte. Voor de toeneming van de lengte is zuurstof noodig, in zuivere stikstof-atmosfeer had namelijk geen groei plaats. Dit deed hem veronderstellen, dat de inwerking van groeistof en de ademhaling met elkaar verband hielden. Inderdaad kon hij bij concentraties van 11 „units” per cc een versnelling der ademhaling van ongeveer 25 % constateeren, terwijl een concentratie van 1100 „units” vergiftiging der planten tengevolge had. Ook bij oudere haverplantjes, welke geen groei meer vertoonden in de auxine-oplossingen, werd de ademhaling verhoogd.

Het door BONNER gevonden effect is niet zonder meer te verklaren en men zou moeten besluiten, dat de groeistof naast elkaar twee onafhankelijke functies kan uitoefenen. Men mag echter niet buiten beschouwing laten, dat deze auteur voor zijn proeven geen gekristalliseerde groeistof, maar de ruwe oplossingen van „rhizopine” gebruikte. Men kan veronderstellen, dat in deze praeparaten bijproducten aanwezig zijn, welke deze proeven kunnen beïnvloeden. Voor deze opvatting pleit uit BONNERS eigen publicatie het volgende:

¹⁾ Een „plant unit” komt volgens BONNER met 4 A.E. overeen.

„Schwabe has shown that various amino-acids in minute quantities stimulate the respiration of *Elodea*, *Fontinalis* and *Potamogeton*. These substances do not, as far as investigated, bring about growth in *Avena coleoptiles*.”

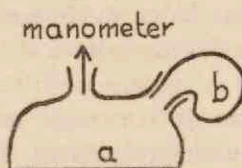
Daar de veronderstelde samenhang tusschen auxine-werking en ademhaling voor het geheele groeiprobleem van de grootste beteekenis was, begonnen wij het vraagstuk eveneens te bestudeeren.

a. De meetmethode

Voor de ademhalingsproeven maakten wij gebruik van de meetmethode, uitgewerkt door O. WARBURG (21).

De methode berust op het volgende principe: koolzuur is in water beter oplosbaar dan zuurstof. Brengt men cellen, welke evenveel koolzuur vormen als zuurstof verbruiken, in een gesloten vat, dan verandert de gasdruk niet, daar de gasvorming en het gasverbruik elkaar in evenwicht houden. Is echter een vloeistofvolumen aanwezig, dat overwegend is ten opzichte van het gasvolumen, dan vermindert dit gasvolumen, doordat zuurstof opgenomen wordt, terwijl het gevormde koolzuur in de vloeistof opgelost blijft. In dit geval heeft de ademhaling dus een vermindering van de gasdruk tengevolge. Er zijn verschillende manometers geconstrueerd om de gasdrukken te meten. Wij gebruikten het model „Blutgasmanometer” van HALDANE en BARCROFT (8), een open manometer, welke ons in staat stelde, de volumenverandering onder constante druk te meten. Het was mogelijk 0,1 mm³ nauwkeurig af te lezen. De manometer werd met de Brodiesche vloeistof gevuld. Deze is een oplossing van 23 gram keukenzout en 5 gram choleinezuurnatrium in 500 cc water; om de bacteriegroei tegen te gaan, worden zooveel cc alcoholische thymol-oplossing toegevoegd, dat de vloeistof er duidelijk naar ruikt. De Brodiesche vloeistof heeft het voordeel, dat ze glas beter bevochtigt dan water.

Aan de manometer was met een slijpstuk het ademhalingsvaatje (zie fig.) aangesloten. Het vaatje (a), dat ongeveer 7 cc inhoud had, was door middel van een slijpstukje met een retortvormig kolfje (b) van 2 cc inhoud verbonden. Daardoor was het mogelijk gemaakt, dat het kolfje (b) gedurende de



proefneming gemakkelijk gedraaid kon worden. Het werd gevuld met groeistof-oplossingen, welke na een bepaalde tijd, door het 180° te draaien, in vaatje a konden worden gebracht. Wanneer de vaatjes gevuld en aan de manometers aangesloten waren, werd het geheele toestel op een rek bevestigd en geschud met een snelheid van ongeveer 200 schommelingen per minuut. We werkten steeds met niet meer dan 6 vaatjes, om in verband met de afleestijd de schudtijd tusschen de aflezingen niet te kort te doen zijn. Hierbij diende minstens één vaatje om de schommelingen van de temperatuur te controleren, daar de gebruikte manometer-vloeistof vergeleken met kwik¹⁾ zeer veel gevoeliger is voor zelfs geringe temperatuursveranderingen.

Er werd gemeten in de ruimte, waar de haverplanten werden gekweekt; in deze kamer gebruikten wij oranje licht²⁾ en er heerschte een temperatuur van $22-23^\circ$ C. De vaatjes met plantenstukjes bevonden zich in een tegen het oranje licht afgeschermd thermostaat.

b. Ademhaling bij toevoeging van auxinen

De ademhaling werd bepaald van de stengels van *Avena sativa*. Zooals bij de testmethode van WENT gebruikten wij ook

¹⁾ Een vloeistofzuil van 10.000 mM. staat gelijk met een kwikzuil van 760 mM.

²⁾ Lichtfilter OG 2 van Schott, Jena.

voor deze proeven SVALÖFS „Sieges” haver. De gepelde korrels werden na een uur weken in water op vochtig filtreerpapier uitgelegd, na 20 uren bevestigd in glashouders boven bakjes met water. Na 88 uren waren de plantjes dan geschikt voor de proeven. Ze werden gedecapiteerd en $1\frac{1}{2}$ uur later in stukjes van ± 3 mm gesneden. Ieder vaatje werd gevuld met 100—150 stukjes in 5 cc „verdunningsvloeistof”. Deze vloeistof bevat 160 mgr KCl en 0,2 cc ijsazijn per liter gedestilleerd water.

Bij het uitvoeren van de WENTSche testreactie met zuivere of ver gezuiverde auxinepraeparaten is het F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT gebleken, dat men de benodigde verdunningen het best met genoemde „verdunningsvloeistof” bereidt. Klaarblijkelijk is het zwak zure milieu en de aanwezigheid van een electrolyt bevorderlijk voor de overgang van de auxinen van uit het agar-agarblokje in de plant. Ook voor onze proeven over de ademhaling hadden wij natuurlijk het grootste belang, dat het toegediende auxine werkelijk snel in de plantestukjes dringt, wat bij de toepassing van onze verdunningsvloeistof door de ervaring met de test bewezen is. Door andere onderzoekers werd voor de ademhalingsproeven een M/50 fosfaatbuffermengsel gebruikt. Wij hebben de ademhaling bij toepassing van dit buffermengsel vergeleken met diegene in onze verdunningsvloeistof. Er kon geen verschil geconstateerd worden, zoodat wij verder om boven genoemde redenen voor onze proeven de „verdunningsvloeistof” gebruikten.

Het is bekend, dat aan verse snijvlakken de ademhaling verhoogd is. Wij zijn daarom met de eigenlijke metingen na $1\frac{1}{2}$ uur schudden begonnen, waarbij dan bovendien de toestellen reeds lang een constante temperatuur bereikt hadden. De stand van de manometers werd dan om het kwartier afgelezen.

De afgelezen waarden worden uitgezet tegen de tijd, waardoor een curve van het verloop in fig. 1 ontstond. Daaruit is de zuurstofopname per uur gemakkelijk af te lezen.

TABEL I

Tijd	I	II	III	IV	V
11.40	12.88	14.59	13.45	12.48	13.12
12.00	13.66	15.80	14.20	12.36	15.60
12.15	14.31	17.00	14.80	12.40	17.00
12.30	15.00	18.40	15.35	12.34	18.50
12.45	15.70	19.75	16.00	12.30	19.90
1.06	16.60	21.60	16.80	12.20	22.00
1.23	17.30	23.00	17.60	12.25	23.60
2.00	18.60	26.50	19.00	12.20	27.10

De vaatjes I, II, III, V zijn met stukjes van haverstengels gevuld, vaatje IV bevatte alleen verdunningsvloeistof, verandering van het volumen diende hier ter controle van de temperatuur. De vaatjes werden om 10 uur gevuld en om 11.30 gesloten.

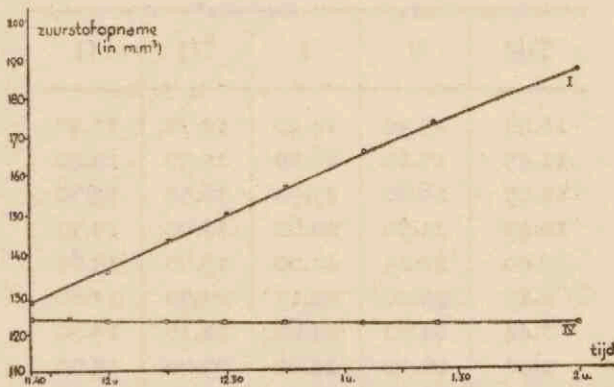


FIG. I

Curve I verkregen uit de waarden van kolom I.

Curve IV verkregen uit de waarden van kolom IV (temperatuurcurve.)

Wij begonnen onze proeven met het verloop der ademhaling over een langere tijd na te gaan en kwamen tot de conclusie,

dat de intensiteit eerst na 5 uur langzaam begint af te nemen. Daar onze proeven altijd binnen deze tijd plaats hadden, zijn wij zeker, onder „normale” en vergelijkbare omstandigheden te hebben gewerkt. De eigenlijke proeven werden dan zoo uitgevoerd, dat de vaatjes na het vullen en aansluiten aan de manometers eerst $1\frac{1}{2}$ —2 uur werden geschud. Daarna werd eenige tijd om het kwartier afgelezen en vervolgens uit het zijkolffje de groeistofoplossing toegevoegd, weer geschud en opnieuw om het kwartier afgelezen.

In het zijkolffje werd altijd een zoodanig geconcentreerde oplossing gedaan, dat na de toevoeging het gewenschte aantal A.E. per cc in het ademhalingsvatje aanwezig was. Bij de controleproeven werd het zijkolffje met verdunningsvloeistof gevuld. We onderzochten verschillende concentraties van heteroauxine, nl. 15—70—150—300—750—1500 A.E. per cc,

TABEL 2

Tijd	V	I	III	II
11.25	15.30	14.40	13.70	13.40
11.45	17.10	16.20	15.30	13.40
12.05	18.60	17.70	16.55	13.70
12.45	21.50	20.60	19.00	13.70
1.00	22.25	21.20	19.60	13.60
1.15	23.20	22.15	20.70	13.80
1.44	24.80	23.80	22.10	13.70
2.04	26.10	25.00	23.20	13.90
2.27	28.00	26.40	24.40	13.80
2.45	29.00	27.60	25.50	13.80
3.10	—	29.40	26.90	13.70

De vaatjes zijn gevuld om 11 uur, de no.'s I en III met heteroauxine, 70 A.E. per cc, no. V zonder heteroauxine, no. II diende voor de temperatuurcontrole. Om 1.50 werd het auxine bijgevoegd.

berekend op een werkzaamheid van 25 milliard A.E. per gram.

Tabellen en figuren 2 en 3 geven de afgelezen waarden voor 70^1) en 1500 A.E. per cc aan.

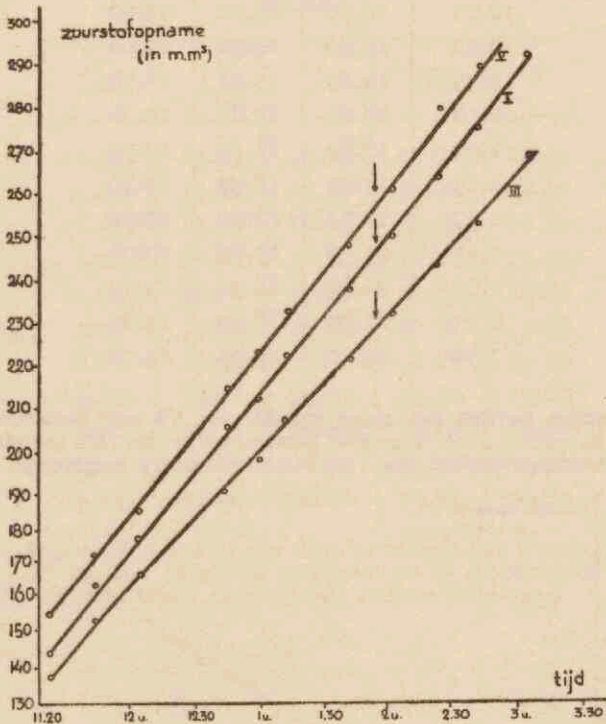


FIG. 2

I en III met hetero-auxine, V zonder hetero-auxine Bij de pijl werd het hetero-auxine toegevoegd.

¹⁾ Deze concentratie komt omstreeks overeen met die, welke bij de proeven van BONNER invloed uitoefende.

TABEL 3

Tijd	VI	I	III
12.05	14.90	14.20	13.90
12.22	16.20	14.90	13.80
12.35	17.25	15.35	13.70
12.50	18.20	15.85	13.70
1.00	18.80	16.10	13.70
1.15	19.70	16.70	13.50
1.30	20.70	17.20	13.70
1.45	21.70	17.80	13.90
2.00	22.65	18.30	13.70
2.15	23.50	18.90	13.80
2.30	24.40	19.30	13.70

De vaatjes werden om 10.30 gevuld, no. VI met hetero-auxine, 1500 A.E. per cc.; no. I zonder hetero-auxine, no. III diende voor de temperatuurcontrole. Om 1.05 werd het auxine toegevoegd.

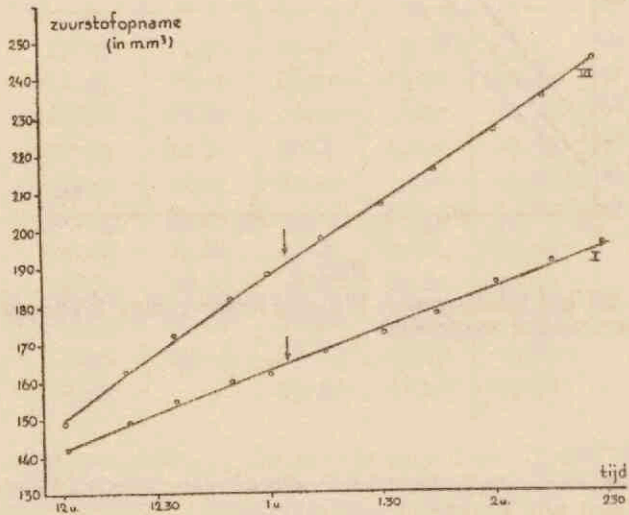


FIG. 3 VI met hetero-auxine, I zonder hetero-auxine. Bij de pijl werd het hetero-auxine toegevoegd.

Van auxine-a onderzochten we oplossingen, die 7—500—1000 A.E. per cc bevatten, berekend op een werkzaamheid van 50 milliard A.E. per gram. Tabellen en figuren 4 en 5 geven de afgelezen waarden voor 7 en 1000 A.E. per cc aan.

TABEL 4

Tijd	II	I	III	V
12.45	13.45	13.70	14.50	13.40
1.00	14.30	15.40	15.90	13.40
1.15	15.00	16.60	16.90	13.70
1.30	15.85	18.20	18.00	13.70
1.45	16.60	19.60	19.05	13.80
2.00	17.50	21.00	20.20	13.70
2.15	18.30	22.40	21.25	13.70
2.30	19.00	23.80	22.30	13.60
2.45	19.85	25.30	23.45	13.70
3.00	20.50	26.75	24.50	13.70
3.25	21.30	28.20	25.50	13.80

De vaatjes werden om 11 uur gevuld, de no.'s I en III met auxine-a, 7 A.E. per cc; no. II zonder auxine-a; no. V diende voor de temperatuurcontrole. Om 1.45 werd het auxine toegevoegd.

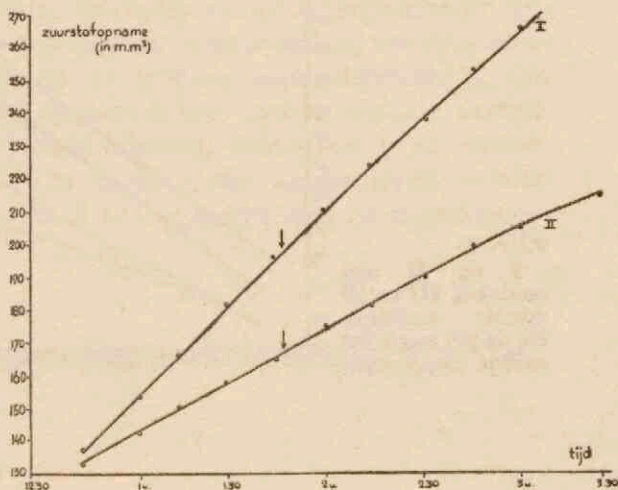


FIG. 4 I met auxine-a, II zonder auxine-a. Bij de pijl werd het auxine-a toegevoegd.

TABEL 5

Tijd	I	II	III	IV	V
12.45	13.80	13.90	15.10	16.50	14.24
1.10	15.00	15.40	17.20	18.60	14.32
1.25	15.60	16.20	18.30	19.50	14.19
1.40	16.40	17.30	19.60	21.00	14.05
1.55	16.90	18.30	20.70	22.30	14.05
2.10	17.50	19.00	22.10	23.70	14.10
2.25	17.90	20.00	23.10	24.60	14.05
2.45	18.50	21.30	25.00	26.20	13.80
2.55	18.80	22.00	25.80	26.90	13.90
3.05	19.05	22.70	26.70	27.70	14.05
3.30	19.60	24.50	29.00	29.60	14.05

De vaatjes werden om 11 uur gevuld, de no.'s I en II met auxine-a, 1000 A.E. per cc; de no.'s III en IV zonder auxine-a; no. V diende voor de temperatuurcontrole. Om 2.30 werd auxine toegevoegd.

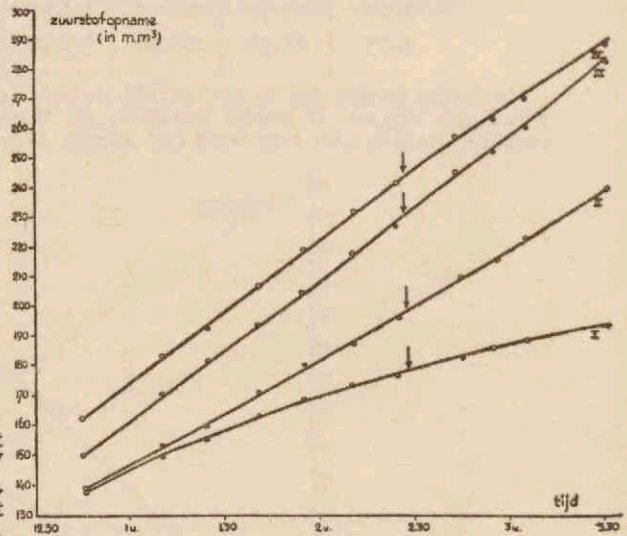


FIG. 5
I en II met
auxine-a, III en IV
zonder auxine-a.
Bij de pijl werd het
auxine toegevoegd.

Wanneer auxine of hetero-auxine eenige invloed op de snelheid der ademhaling uitoefende, zou men bij het grafisch uitzetten der meetresultaten een afwijking der curven naar boven resp. naar beneden moeten vinden.

In geen enkel geval echter bleek een vertraging of versnelling der ademhaling door invloed van de auxinen plaats te hebben.

c. Ademhaling en gevoeligheid der planten voor auxinen

Bij onze steeds uitgevoerde contrôleproeven zonder auxine-toevoeging bleek, dat de ademhaling van dag tot dag verschillend kan zijn, ofschoon de planten altijd precies even oud waren en op gelijke wijze gekweekt werden. F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT (16) hadden er reeds op gewezen, dat ook bij de WENTSche test met haverplantjes belangrijke dagelijksche schommelingen optreden, zooals uit het regelmatig uitmeten van auxine-standaardoplossingen bleek.

We hebben daarom nagegaan of tusschen deze twee verschijnselen een verband zou kunnen bestaan. Er werd daarom tegelijkertijd de ademhaling alsmede de gevoeligheid voor auxine-oplossingen bij de WENTSche testreactie bepaald met plantjes, welke onder volkomen gelijke omstandigheden gekweekt waren. De bepaling van de groeiwerking van de auxine-oplossingen werd op de gewone wijze uitgevoerd¹⁾. Om de intensiteit van de ademhaling vast te stellen, werkten we met 5 vaatjes zonder zijretort, welke met 5 cc verdunningsvloeistof en 100 stukjes van haverstengels werden gevuld. Eén vaatje werd weer gebruikt voor de temperatuurcontrôle.

¹⁾ Voor de uitvoering hiervan danken wij de heer E. W. F. VISSER.

TABEL 6

Tijd	VIII	II	XII	IV	I	VI
2.30	9.20	10.70	8.85	9.10	6.75	9.60
2.45	9.50	12.30	9.45	10.15	7.00	10.90
3 uur	10.40	14.20	9.90	11.30	6.90	12.90
3.15	10.90	15.90	10.70	12.50	6.75	14.70
3.30	11.70	17.65	11.10	13.60	6.60	16.10
3.47	12.30	19.95	12.00	14.60	6.55	17.90
4 uur	12.90	21.30	12.55	15.35	6.60	19.25

De vaatjes VIII, II, XII, IV en VI waren gevuld met stukjes van haverplantjes in verdunningsvloeistof. Vaatje I diende voor temperatuurcontrole.

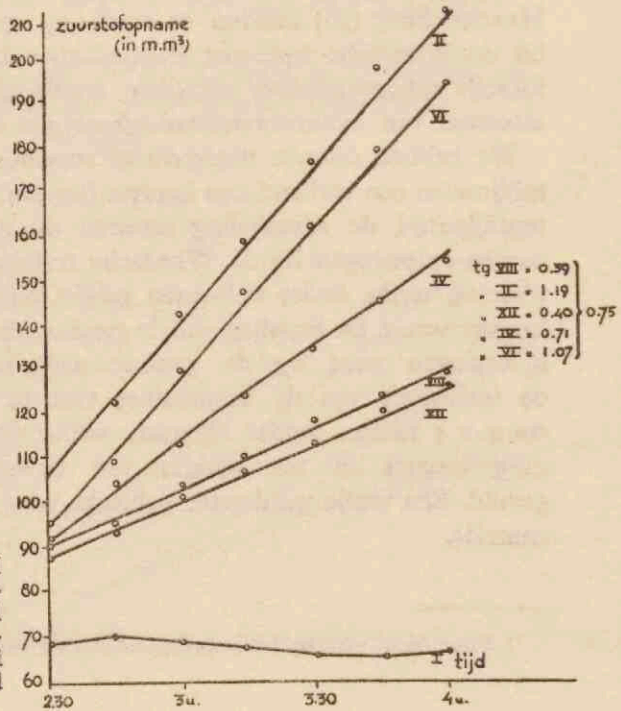


FIG. 6

II, VI, IV, VIII en XII uit de kolommen van tabel 6. I temperatuurcurve. Standaard bedroeg 48 milliard A.E. per gram.

Ter vergelijking met de waarde van de auxinestandaard bij de Avena-test hebben wij de snelheid van de ademhaling genomen, uitgedrukt door de tangens der curve.

We gebruikten steeds dezelfde vaten, waardoor de dagelijkse schommelingen van ieder vat afzonderlijk te vergelijken waren, zonder dat het noodig was met de verschillende vat-

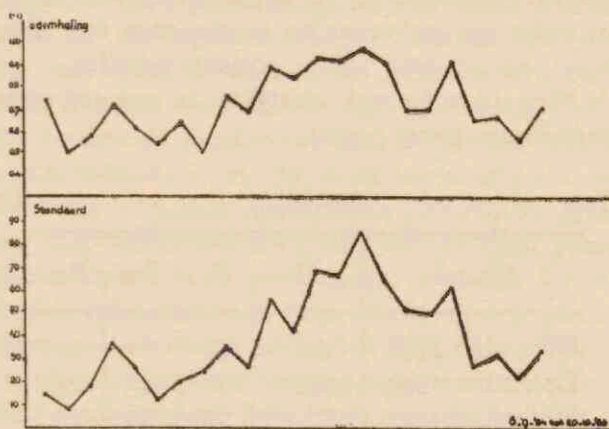


FIG. 7

Ademhaling (in log tg). Standaard (in milliarden A.E. per gram).

constanten rekening te houden. Men ziet bij beschouwing van fig. 6 dat bijvoorbeeld voor vaatje no. 2 de tangens 1,19 bedraagt bij een auxine-standaardwaarde van 48 milliard A.E./g; de tangens schommelde bij een tiental proeven tusschen 0,71—1,21. Op deze manier werd iedere dag de tangens van de bepalingen in de vijf in gebruik zijnde vaten berekend en het gemiddelde hiervan vastgesteld.¹⁾

Fig. 7 geeft voor een langer tijdinterval het verband weer tusschen de snelheid der ademhaling en de activiteit van de auxinen in Avena-Eenheden. Behoudens een enkele afwijking

¹⁾ Indien men voor ieder vaatje afzonderlijk de waarden uitzet, krijgt men evenwijdige curven.

is er uit deze vergelijking toch een zekere paralleliteit tusschen ademhaling en gevoeligheid der plantjes voor auxine op te maken en we stonden nu opnieuw voor de vraag, waaraan de standaardschommelingen, alsmede nu ook de afwijkingen der ademhaling te wijten zijn.

Er was reeds uit onderzoekingen van F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT bekend, dat de gevoeligheid voor auxine bij planten, welke gekweekt werden in cassetten van zink, lood en bakeliet, hooger was dan in normale gevallen.

Wij hebben dit onderzoek voortgezet en ook nog uitgebreid met cassetten van zwart papier.

TABEL 7

Maand	N	Zi	Zw	Par
November 1934	41	57	—	—
December 1934	39	52	51	—
Januari 1935	37,5	51	55	—
Februari 1935	43	—	66	—
Maart 1935	37	—	65	—
April 1935	57	—	—	70
Mei 1935	66	79	—	96
Juni 1935	55	83	—	84
Juli 1935	44	68	—	69

N = normaal, „standaard”
 Zi = Zink, „standaard”
 Zw = Zwart-papier, „standaard”
 Par = Paraffinedoos, „standaard”
 werkzaamheid in milliarden A.E. per gram.

Zoals uit tabel 7 blijkt, waren de in de verschillende cassetten gekweekte planten gevoeliger voor auxine dan de gewone testplanten, welke onder de invloed van het oranje licht van de proefkamer stonden. In deze samenhang was het in-

teressant om na te gaan of ook de *ademhaling* bij deze verschillend gekweekte planten anders was dan onder „normale” omstandigheden. Om dit uit te maken, werd van een serie haverplantjes met precies dezelfde voorbehandeling, een deel volgens de testmethode van WENT op gevoeligheid tegen auxine onderzocht, terwijl van de rest tegelijkertijd de ademhaling kon worden gemeten. De desbetreffende proeven wezen uit, dat bij alle „cassettenplanten” de snelheid der ademhaling ten opzichte van normale planten verhoogd en wel tamelijk constant verhoogd is. (Zie fig. 8 en 9).

Het essentiële verschil tusschen de gewone testplanten en de „cassettenplanten” is, dat laatstgenoemden niet onder de invloed van het oranje licht van de proefruimte groeiden. Er is wel aangetoond, dat dit licht geen (of haast geen) phototropische krommingen veroorzaakt, maar het kan natuurlijk invloed op onbekende chemische reacties in de plant uitoefenen. Volgens een vriendelijk advies van Prof. V. J. Koningsberger zou het bijvoorbeeld ook mogelijk zijn, dat de testplanten onder invloed van het oranje licht reeds assimileeren. Om dit uit te maken, zou een speciaal vergelijkend onderzoek noodig zijn, dat buiten het doel van ons eigen onderzoek ligt.

Wij willen alleen nog op het volgende wijzen: Indien de plantenstukjes gedurende de meting van de ademhaling assimileerden, zouden de voor de ademhaling gevonden waarden te klein zijn. Ofschoon dit het verschil tusschen „oranjelichtplanten” en „casettenplanten” zou kunnen verklaren, lijkt ons deze veronderstelling niet zeer waarschijnlijk, omdat de met de plantenstukjes gevulde vaatjes zich in de tegen het oranje licht afgeschermden thermostaat bevonden en bovendien de eigenlijke meting altijd eerst na $1\frac{1}{2}$ uur schudden uitgevoerd werd.

In elk geval gaat onder de beschreven omstandigheden een grootere gevoeligheid voor auxine samen met een intensievere ademhaling, en — wanneer we veronderstellen, dat de ademhaling het primaire effect is — zouden wij de verhooging der

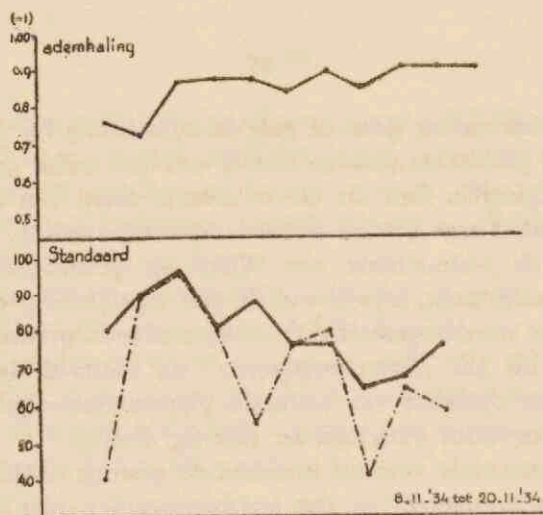


FIG. 8

Ademhaling en standaard in Zink-cassette. Ademhaling in log tg; werkzaamheid in milliarden A.E. per gram — standaard in cassette — — — standaard normaal.

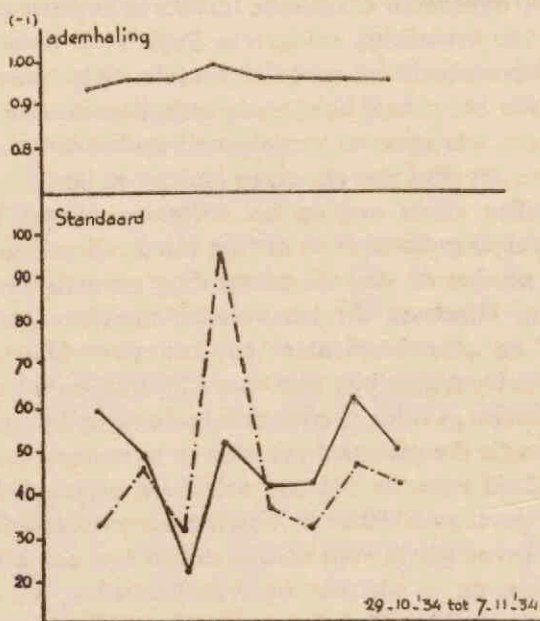


FIG. 9

Ademhaling in bakeliet-cassette. Ademhaling in log tg; werkzaamheid in milliarden A.E. per gram — standaard in cassette — — — standaard normaal.

auxine-werkzaamheid als gevolg daarvan kunnen verklaren. Natuurlijk is de moeilijkheid daardoor alleen maar verplaatst, want het blijft nu nog altijd de vraag, aan welke factoren de versnelling en algemeen de schommelingen bij de ademhaling te wijten zijn. Het zal niet gemakkelijk worden, al de eventueel hierbij meewerkende factoren één voor één uit te zoeken, daar onze kennis van deze verschijnselen nog zeer onvolkomen is. In de eerste plaats moest worden onderzocht of bij een kunstmatig beïnvloeden van de ademhaling ook de gevoeligheid voor auxine met de veranderde ademhaling parallel loopt.

Er bestaan verschillende middelen om de ademhaling der planten te veranderen; we moesten echter alle inwerkingen, welke een schadelijke chemische invloed konden uitoefenen, al van te voren uitsluiten. Zoo hebben we b.v. niet getracht, de planten met aethyleen, aether enz. te behandelen, maar begonnen in oriënteerende proeven ermee, de zuurstofdruk te verhoogen. De planten werden in exsiccatoren met zuivere zuurstof gekweekt, waarbij natuurlijk de temperatuur en vooral het vochtigheidsgehalte zoo veel mogelijk in overeenstemming met de vroegere proeven gehouden werd. Er was onder deze omstandigheden een intensievere ademhaling te verwachten en — wanneer onze redeneering juist was — ook een hogere standaardwaarde voor auxine. Inderdaad geven de standaardbepalingen iets hogere waarden voor de planten, gekweekt in zuurstof. Planten, op normale wijze gekweekt, maar gedurende de test in zuurstof gebracht, reageeren daarentegen op normale wijze: tabel 8 en 9.

Als resultaat vonden we dus, dat er geen directe invloed van zuivere auxine op de ademhaling der Avena-stengels bestaat, daarentegen gaat bij haverplantjes een hogere ademhaling gepaard met grootere gevoeligheid voor de inwerking van auxine.

H. BOTTELIER (3) vond bij een onderzoek over protoplasma-

TABEL 8

Serie I					
A	B	A	B	A	B
56	42	52	32	74	42
64	44	44	30	100	50
48	32	40	38	58	46
30	41	55	31	58	34
64	55	45	36	35	40
35	42	56	50	42	27
35	24	59	48	73	54
48	38	44	24	64	22
48	28	100	80	56	51
45	38	90	51	37	43
45	40	67	32	34	28

Kolom A bevat de waarden voor de auxine-werkzaamheid uitgedrukt in milliarden A.E. per gram, van planten gekweekt in zuivere zuurstof (1 atmosfeer). Iedere waarde werd verkregen uit een gemiddelde van 12 plantjes.

Kolom B bevat deze waarden voor „normaal” gekweekte planten.

TABEL 9

Serie II			
A	B	A	B
28	30	40	54
53	64	37	22
40	45	38	51
38	42	55	43
53	50	64	28
45	46	27	13
53	34	32	26
42	40	26	36
54	27	30	37

Kolom A bevat de waarden voor de auxine-werkzaamheid uitgedrukt in milliarden A.E. per gram, voor planten, gedurende de test gebracht in zuurstof van 1 atmosfeer. Iedere waarde werd verkregen uit een gemiddelde van 12 plantjes.

Kolom B bevat deze waarden voor normaal gekweekte planten.

Serië I	Gemiddelde gekweekt in O ₂	= 55 milliarden A.E. per gram
	„ normaal	= 40 „ A.E. „ „
Serië II	Gemiddelde normaal gekweekt	
	maar in O ₂ getest	= 42 milliarden A.E. per gram
	Gemiddelde normaal	= 38 „ A.E. „ „

strooming bij *Avena sativa*, dat de stroomingsintensiteit iedere dag verschillend was en zelfs in de loop van de dag kon veranderen. Hij heeft deze schommelingen van de intensiteit vergeleken met de schommelingen der standaardwaarden, die door F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT gevonden zijn en nu bleek op dagen met groote gevoeligheid tegen auxine ook een groote stroomingsintensiteit te bestaan. Ook bij de bijzonder gevoelige „cassettenplanten” werd een hogere stroomingsintensiteit gevonden. BOTTELIER komt tot de volgende conclusie:

„Obgleich die Versuche nicht als endgültig beweisend zu betrachten sind, ist doch mit grosser Wahrscheinlichkeit zu schliessen, dass zwischen Intensität der Protoplasmaströmung und Empfindlichkeit der Zelle für Wuchsstoff ein direkter Zusammenhang besteht.”

De protoplasmastrooming blijkt nu op verschillende wijze te beïnvloeden, o.a. door verwonding. Speciaal in de nabijheid der wond treedt een sterke strooming op; aan de andere kant is het bekend, dat ook de ademhaling bij verwonding versneld wordt. Wij mogen dus veronderstellen, dat tusschen al deze verschillende verschijnselen een nauw verband bestaat; welke functie in de plant echter primair beïnvloed wordt door uitwendige factoren, blijft een open vraag.

HOOFDSTUK III

Bios en factor Z

a. Overzicht over de ontwikkeling van het bios-probleem

In 1860 kwam PASTEUR (46) tot de conclusie, dat voor de groei van gist alleen anorganische zouten en suiker noodig waren. Het was in dezelfde tijd, dat LIEBIG (40) had geconstateerd onder deze omstandigheden geen gisting of groei te kunnen verkrijgen. PASTEUR, die een groot liefhebber was van het experiment in het openbaar, noodigde LIEBIG nu uit om bij hem te komen, daar hij onder zijn contrôle wilde laten zien, dat hij wel degelijk in staat was, het gewenschte effect te verkrijgen. LIEBIG reageerde niet op deze uitdaging en zoo bleef de openbare meening jaren lang ten gunste van PASTEUR, zonder dat het probleem hierdoor was opgelost.

Ongeveer 30 jaren later, in 1901, ontdekte E. WILDIERS (49) in het laboratorium van IDE in Leuven, dat hij geen gist kon kweken in een suiker-zout oplossing, wanneer hij met weinig cellen geënt had, maar dat hierbij nog een toevoeging van een kleine hoeveelheid gistextract, wort of pepton noodig was. Deze resultaten kwamen dus geheel overeen met de ondervinding van LIEBIG. WILDIERS noemde de voor de groei van zijn gist noodige stof, die organisch en thermostabiel bleek te zijn „Bios”.

Toch wilde men nog niet aan een dergelijke stof gelooven, vermoedelijk nog steeds onder de invloed, welke PASTEUR op de wetenschap van zijn tijd uitgeoefend had. Van verschillende kanten kwam er kritiek op het werk van WILDIERS, soms nog niet eens door experimenten gesteund.

FERNBACH (32) en WINDISCH (50) b.v. namen zonder meer aan, dat de voedingsoplossingen van WILDIERS giftige stoffen zouden hebben bevat, zooals sporen van metaalzouten, welke dan door de eiwitten uit het gistextract zouden worden gebonden.

Hoe onhoudbaar een dergelijke veronderstelling is, was door KRÜGER (38) bewezen, die juist het tegenovergestelde vond, n.l. dat sporen metaal de gistgroei kunnen stimuleeren. Ook PRINGSHEIM (48) was zeer sterk gekant tegen de bios-theorie en wilde al de door WILDIERS waargenomen verschijnselen verklaren door aan te nemen, dat de gist in de synthetische voedingsbodem zou moeten acclimatiseeren. Hij wilde dan wel gelooven, dat er stoffen waren, die de gistgroei konden bevorderen, maar niet aannemen, dat ze *onontbeerlijk* voor de normale groei waren. Zoo waren er meerdere onderzoekers, die niet wilden toegeven, dat er een stof als het Bios noodzakelijk was, al konden zij dan ook niet ontkennen, dat er werkelijk stoffen bestonden, welke de gistgroei stimuleerden.

LASH MILLER (43) merkt in dit verband heel aardig op: „Thus the new word „Bios” was defined; and all who say „no doubt some chemical in wort makes all the difference, but it need not be Bios” have qualified to join the Last Ditch Bacon-Club, which holds that Shakespeare’s plays were written not by Shakespeare, but by some other bearing the same name.”

Met al deze tegenkanting werd echter het probleem niet noemenswaard gediend en er moesten nog jaren verstrijken, eer aan de afbrekende kritiek het zwijgen kon worden opgelegd. Pas na de ontdekking van de vitaminen, toen bleek, dat voor de normale ontwikkeling der dieren behalve de gewone voedingsstoffen ook nog uiterst geringe hoeveelheden van verschillende specifieke verbindingen noodig waren, kon men zich voorstellen, dat dit ook voor plantaardige organismen en dus ook voor gist het geval kon zijn.

Volgens KURONO (39) zou het anti-beri-beri-vitamine ook de groei van gist kunnen bevorderen. R. J. WILLIAMS (51) ging zelfs zoover de identiteit van zijn groeiverwekkende factor met „vitamine B”¹⁾ te veronderstellen en baseerde hierop een

¹⁾ Later vitamine B₁ (Aneurine) genoemd.

quantitatieve methode om dit vitamine met behulp van gist inplaats van met kostbare proefdieren te isoleeren.

Later vonden echter andere onderzoekers, zooals EMMET en STOCKHOLM (27), FLEMING (33), FULMER (34) en anderen, dat praeparaten met een sterke bios-werking *geen* antineuritische werking hadden en dus niet met „vitamine B” identiek konden zijn.

Een belangrijke vooruitgang voor het geheele bios-probleem was de door A.M. COPPING (25) en R. J. WILLIAMS (52) gedane ontdekking, dat de verschillende gistrassen niet gelijk reageeren op bios-toevoeging. Wanneer men wilde gist en gecultiveerde gistrassen uit de praktijk laat groeien op een zelfde voedingsbodem, dan heeft de laatste soort voor een normale ontwikkeling bios noodig, de eerste echter niet. Het bleek heel algemeen, dat verschillend gecultiveerde gistrassen ook heel verschillende hoeveelheden bios voor hun groei noodig hadden. Wilde gisten kunnen bios produceeren en geven dit zelfs aan hun voedingsbodem af, welke dan zeer geschikt wordt voor het kweken van gecultiveerde rassen. Nadat dus aan het bestaan van „bios” niet langer getwijfeld kon worden, begon men ongeveer 12 jaar geleden zich meer speciaal bezig te houden met de isoleering van deze cellenvermeerderende stof, en wel met gebruikmaking van een test, welke op deze eigenschap berustte.

De zaak werd echter nog ingewikkelder, toen in de loop der volgende onderzoeken bleek, dat er verschillende bios-factoren moesten bestaan. G. H. W. LUCAS (41) bracht door behandeling met bariet in alcoholische oplossing een scheiding in factoren teweeg. De factor in het neerslag, welke hij bios I noemde, was te praecipiteeren met basisch loodacetaat. In het filtraat was dan nog een andere factor aanwezig. EASTCOTT (26) kon bios I gekristalliseerd verkrijgen en wel uit thee; de verbinding bleek identiek te zijn met meso-inosiet.

LASH MILLER (44) kon bij bios II uit gist nog een verdere scheiding bereiken; wanneer hij een extract schudde met kool,

bleek maar een gedeelte der werkzame stof in het filtraat te zijn gebleven. Met behulp van aceton en ammonia werd een werkzaam eluaat van kool verkregen, waarvan de actieve factor bios IIB genoemd werd. De in het filtraat aanwezige actieve factor noemde hij bios IIA. Werd alleen bios IIB bij de gist gevoegd, dan vertoonde het een goede werkzaamheid, terwijl de andere factoren ieder voor zich niet actief waren. Werden de drie factoren echter weer samengevoegd, dan hadden zij hetzelfde effect als het oorspronkelijke gistextract.

Ook R. J. WILLIAMS (54) kon een scheiding van het bios-complex teweeg brengen, op een geheel andere wijze, dan LASH MILLER, n.l. met Vollers aarde. De verkregen fracties reageerden verschillend op een reeks gistsoorten, op sommige reageerden zij zelfs in het geheel niet. Uit een rijstzemelenextract kon met behulp van dezelfde methode een factor verkregen worden, die identiek was met het aneurine van JANSEN en DONATH.

Een ander verloop der scheiding verkreeg WILLIAMS (53) met behulp van electro-dialyse. Het gelukte hem hierdoor een factor met zure eigenschappen te concentreren en deze werd door hem „panthothenic acid” genoemd. Volgens hem zou deze verbinding een verzadigd alifatisch poly-oxy-zuur zijn.

De soms zeer uiteenlopende resultaten der verschillende onderzoekers zijn heel moeilijk te vergelijken, omdat zij verschillend uitgangsmateriaal gebruikten, alsook voor hun test verschillende gistrassen. Zooals wij reeds hebben besproken, is dit van essentieel belang. Bovendien zijn natuurlijk ook de meetmethoden, de samenstelling der voedingsoplossing en de kweektemperatuur van invloed, om maar enkele der factoren te noemen.

F. KÖGL en B. TÖNNIS te Utrecht vatten eenige jaren geleden het onderzoek over bios op. Eerst werd een goede meetmethode uitgewerkt, welke hierop neerkomt, dat men het verschil in troebeling, veroorzaakt door een grootere of kleinere hoeveel-

heid gist, meet met behulp van een gevoelige nephelometer¹⁾.

Als testobject gebruikten zij de z.g. „Heferasse M”, een „Brennerei Oberhefe” welke door het Institut für Gärungsgewerbe te Berlijn in het groot wordt gekweekt; het is een mengsel van vier onderrassen.

Voor de isoleering der biosfactoren gingen KÖGL en TÖNNIS (36) uit van Chineesch eigeel, dat meer bios bevat dan gist en dus als uitgangsmateriaal voor de bereiding van deze stof meer geschikt is. Natuurlijk zal het in een dergelijk geval noodig zijn, achteraf de identiteit van de actieve stoffen uit gist en uit eigeel te bewijzen. Met behulp van de gewone methodes, zooals neerslagen met alcohol, loodzouten, sublimaat, phosphorwolframuur, broompikrolonzuur, adsorptie aan dierlijke kool en eluering met aceton-ammoniak, werden onwerkzame stoffen verwijderd of het werkzame product geconcentreerd. Het zoo verkregen gezuiverde product werd veresterd en in hoogvacuum gedestilleerd; uit de zeer actieve middenfractie kristalliseerden fijne naaldjes, welke na omkristalliseeren een smeltpunt van 148° C. en een werkzaamheid van 25—30 millioen S.E.²⁾ hadden. De nieuwe stof werd biotine genoemd. Voor de isoleering van biotine is een 3 millioenvoudige concentratie noodig, zoodat de auteurs maar over zeer kleine hoeveelheden konden beschikken. Indien in gist dezelfde stof aanwezig is, zou men voor de bereiding van 1 gram eenige honderden tonnen gist moeten opwerken.

KÖGL en VAN HASSELT (35) konden verder factor I, welke door EASTCOTT reeds uit thee was bereid nu ook uit gist isoleeren; het bleek, dat ook bios I uit gist met meso-inosiet identiek was. Bovendien kon worden bevestigd, dat de werking van meso-inosiet heel specifiek was; zoo zijn bijvoorbeeld andere

¹⁾ Deze meetmethode is nauwkeurig beschreven in de dissertatie van W. v. HASSELT (35)

²⁾ 1 S.E. is de hoeveelheid biotine, welke een celvermeerdering van 100% veroorzaakt bij 240 γ. gist in 2 cc voedingsoplossing (v. READER) gedurende 5 uren bij 30° C.

nauw verwante alcoholen, zooals scylliet en l-inosiet, niet in staat, het meso-inosiet te vervangen. Meso-inosiet komt zeer algemeen verbreid voor in plant en dier; zoo vermeldt EAST-COTT een honderdtal verschillende producten, waarin deze stof kan worden aangetoond. Het schijnt steeds voor te komen in groeiende weefsels, maar b.v. niet in zaden. Hierin wordt het pas weer gevormd, wanneer men deze laat kiemen.

KÖGL, TÖNNIS en VAN HASSELT vonden, dat met de twee gekristalliseerde factoren meso-inosiet en biotine de volle werking van het gistextract nog niet was bereikt, maar dat daarvoor nog één of meer andere factoren noodig waren. Deze factoren hebben op zichzelf bij „ras M” resp. bij de 4 onderrassen ieder voor zich geen werking, verhoogden echter de werkzaamheid van het biotine. VAN HASSELT vond, dat een dergelijke „co-werking” ook door aneurine tot stand komt. Het is bekend, dat aneurine in gist voorkomt, toch is het niet waarschijnlijk, dat bovengenoemde co-werking uitsluitend door deze stof veroorzaakt wordt. Volgens nog niet gepubliceerde resultaten van dit laboratorium speelt hier tenminste nog één andere stof een rol. In het vervolg wordt deze verbinding voorloopig met „bios IV” en aneurine met „bios III” aangeduid.

„Bios IV” van onze nomenclatuur is misschien identiek met „bios IIA” van LASH MILLER (45), die deze factor als gekristalliseerd koperzout heeft verkregen; volgens deze auteur schijnt de samenstelling te wijzen op een oxy-amino-boterzuur.

Natuurlijk zijn de werkzaamheden van al deze verschillende factoren niet even groot, maar lopen zelfs zeer uiteen. Om een indruk hiervan te geven, diene onderstaande tabel van F. KÖGL, welke tevens aantoonde in hoeverre een factor door een andere kan worden vervangen, en ook, hoe zeer de juiste samenstelling der factoren van belang is voor een optimale werking.

“1 g Hefe gibt in einer Lösung von 42 g Glukose und 23 g anorganischen Salzen folgenden Zuwachs:

	nach 5 Stdn.	nach 10 Stdn.
1. ohne Bios-Zusatz	0,4 g	1—1,5 g
2. mit 4 g Bios I (Inosit).....	0,4 g	1—1,5 g
3. mit 0,00000167 g Biotin	1 g	4 g
4. mit 0,00000167 g Biotin	3 g	7 g
5. mit 0,00000167 g Biotin und 4 g Inosit		10 g

Die für das Hefewachstum erforderliche Inositmenge ist zwar gegenüber der als Kohlenstoffquelle dienenden Glukose als klein zu bezeichnen; man kann jedoch nicht sagen, dass ein kalorischer Effekt des Inosits ausgeschlossen wäre. Die Bedeutung des Inosits erinnert lebhaft an jene gewisser unentbehrlicher Aminosäuren beim tierischen Organismus; man kann auch hier von einem *spezifischen* Nahrungs- oder Baustoff sprechen.

Ganz anders liegen die Verhältnisse beim Biotin; seine Aktivität steht auf einer Linie mit jener der Auxine, der Zoo-hormone und Vitamine."

Het biotine voldoet aan de definitie van een phytohormoon, ofschoon natuurlijk nog aangetoond moet worden, dat de overeenkomstige stof uit plantaardig materiaal daarmee in chemisch opzicht identiek is.

b. Bios en factor Z.

Een gistextract heeft, behalve de reeds besproken eigenschappen van celstrekende en celvermeerderende werking, ook nog het vermogen de gisting te versnellen.

Brengt men in een glucose-phosfaat-oplossing levende gist, dan verkrijgt men in een bepaalde tijd een bepaalde hoeveelheid koolzuur. Voegt men nu hierbij nog een kleine hoeveelheid van een gistextract, dan kan deze koolzuur-productie met eenige honderden procenten worden verhoogd. Gezien de korte tijd,

waarin dit effect optreedt, kan het niet of ten minste niet uitsluitend door een celvermeerdering worden verklaard.

H. VON EULER (28), die deze werking het eerst beschreef, stelde voor de actieve stof „factor Z” te noemen. Van de zijde van Kostytschew kwamen echter bezwaren, want hij meende, de bovengenoemde werking van het gistextract te moeten toekennen aan de reeds bekende co-zymase (VAN HARDEN en YOUNG). KARL MYRBÄCK en VON EULER (29) toonden echter aan, dat co-zymase en factor Z niet identiek waren en wel om verschillende redenen:

1°. Een zeer zuiver co-zymase praeparaat heeft bij levende gist geen verhooging van de gisting tengevolge, kan dus factor Z niet vervangen.

2°. Wordt een gistextract eenige uren gekookt, waardoor de co-zymase, welke niet thermostabiel is, volledig wordt vernietigd, dan blijft in het praeparaat toch de volle „Z-werking” bestaan¹⁾.

3°. Ook in chemisch opzicht zijn de twee factoren verschillend. Factor Z is oplosbaar in 80 proc. alcohol, terwijl de co-zymase reeds door 70 proc. alcohol volledig wordt neergeslagen. Tenslotte zijn er extracten, zooals b.v. moutextract, welke wel factor Z bevatten, maar geen co-zymase.

VON EULER en medewerkers toonden verder aan, dat de „Z-werking” niet te verkrijgen is door normale stofwisselingsproducten, zooals b.v. tryptophaan en histidine, noch door hexose-mono-phosfaten, hexose-di-phosfaten, of bekende aminozuren en purinederivaten. Er werden dan pogingen in het werk gesteld tot isoleering van de stof. Van de eigenschappen noemden wij reeds de thermostabiliteit en de oplosbaarheid in 80 proc. alcohol; verder bleek de factor een groote stabiliteit tegenover zuur en base te bezitten. Neerslagen met bariet,

¹⁾ De opheffing van de co-zymase werking is te testen met een gist, welke volkomen vrij van co-zymase is (apo-zymase) en ook onder de beste voorwaarden van fosfaat- en suikerconcentratie geen spoor van gisting meer vertoont.

phosforwolframzuur of lood-, kwik- en zilverzouten hadden geen succes. Het lag voor de hand te onderzoeken of het anti-neuritische vitamine als activator van de gisting kon fungeeren. Om dit uit te maken paste Philipson (47) de scheidingsmethode van Kinnersley en Peters toe en kon op deze wijze aantonen, dat „vitamine B” en factor Z niet met elkaar identiek waren. De door LUCAS en EASTCOTT voor de scheiding van de bios-factoren uitgewerkte methode deed hem besluiten, dat de stof ook niet identiek is met bios.

Tot nu toe hebben we steeds over *de* factor Z gesproken, maar Philipson kwam later tot de conclusie, dat ook deze factor uit meerdere componenten bestaat. Met metaalhydroxyden was volgens hem n.l. een scheiding te verkrijgen. Een neerslag met basisch loodacetaat — dus de inosiet-fractie — was na ontleding bij zijn testmethode werkzaam; deze fractie kon echter niet door gekristalliseerd meso-inosiet worden vervangen.

In 1934 verscheen een nieuwe publicatie van VON EULER en LARSSON (31), waarin zij de samenhang tusschen bios en factor Z behandelden. Zij onderzochten een gistextract en pasten de scheiding van Lucas toe. Het extract werd behandeld met alcohol, daarna met heete barietoplossing. Aldus werd een neerslag verkregen, dat bios I bevatte. Deze bios I-fractie had geen Z-werking en ook maar een zeer geringe celvermeerderende werking. De oplossing, verkregen door affiltreeren van het Ba-neerslag, werd met aceton behandeld, waardoor een neerslag ontstond, dat zoowel factor Z als bios II bevatte. Ook bij verschillende chemische bewerkingen bleek de celvermeerderende werking parallel te loopen met de Z-werking. De fracties, welke de sterkste bioswerking hadden, hadden ook het hoogste gehalte aan factor Z. VON EULER en LARSSON kwamen tot de volgende conclusie:

„Nun ist der Faktor Bios, wie eingangs wieder erwähnt, definiert durch seinen Einfluss auf die Vermehrung der Hefezellen, während bei Untersuchungen des Z-Faktors auf

Grund der Gärungsbeschleunigung immer streng darauf geachtet wurde, dass keine Änderung der Zellenzahl während der in der Regel 5 Stunden dauernden beschleunigten Gärung eintrat.

Trotzdem scheint es uns jetzt möglich und naheliegend, die beiden Wirkungen auf den gleichen Stoff oder den gleichen Stoffkomplex zurückzuführen. Wir glauben also nunmehr folgende Annahme vertreten zu können: der Faktor Z (bzw. das betr. Stoffgemisch), welcher die Gärung lebender Hefezellen beschleunigt, bewirkt dies auf Grund von Veränderungen in den Hefezellen, welche innerhalb der Gärungszeit zwar noch nicht zu einer Vermehrung der Zellenzahl führt, welche aber die Zellvermehrung bzw. Zellteilung vorbereiten.

Demnach würde ein einziger Faktor ZB = Bios II eine Wirkung auf frische Hefe auslösen, welche in 2 Phasen zum Ausdruck kommt, nämlich

zunächst in der Gärungsbeschleunigung, hervorgerufen durch Neubildungen innerhalb der Zellen, welche

in der zweiten Phase zur Zellteilung, also Zellenvermehrung Anlass gibt. Wir halten also — trotz scheinbar ganz verschiedener Wirkung — *die Identität von Z und Bios II für wahrscheinlich.*"

VON EULER komt dus in zijn laatst genoemd onderzoek tot een geheel andere conclusie dan PHILIPSON enkele jaren geleden in het Stockholmsche laboratorium.

Door de onderzoekingen van KÖGL en TÖNNIS stonden ons in het Organisch chemisch Laboratorium der Rijks-Universiteit te Utrecht zuivere praeparaten van biotine uit eigeel ter beschikking.

Ofschoon het natuurlijk een kwestie van afspraak is, welke biosfactor men „bios II" wil noemen, is het een vaststaand feit, dat biotine zonder toediening van een co-groeistof een celvermeerderende werking op ras M, een bovengist, uitoefent. Aan de andere kant heeft ook VON EULER voor zijn proeven over de „Z-werking" een bovengist gebruikt. Het was daarom zeer interessant, na te gaan, of biotine (eventueel identiek met „bios II") bij ras M inderdaad een versnelling van de gisting veroorzaakt.

HOOFDSTUK IV

Bioswerking en gisting

a. Meetmethode

Om de werking van factor Z te meten, wordt de koolzuur-ontwikkeling van een gistsoort bepaald en vergeleken met de hoeveelheid koolzuur, welke in dezelfde tijd bij aanwezigheid van een Z-paerparaat wordt gevormd. De uitvoering van de testmethode geschiedde op de volgende manier:

1 gram gist werd afgewogen en door schudden fijn verdeeld in 20 cc voedingsoplossing, welke 10% glucose en 1% fosfaatmengsel ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) bevatte. De PH van deze oplossing bedroeg $\pm 5,3$. Van deze suspensie werd telkens 1 cc gepipetteerd in erlenmeyers van 25 cc inhoud, welke reeds x cc van de te onderzoeken oplossing bevatten; elk vaatje werd dan nog aangevuld met (1-x) cc water, zoodat in totaal in ieder kolfje 2 cc vloeistof aanwezig was. De erlenmeyers werden door een gummikurk verbonden met manometers van het op pag. 23 reeds besproken model, met dit verschil, dat we bij onze gistingproeven als manometervloeistof kwik gebruikten. Deze manometers stelden ons in staat, het aanwezige gasvolumen op 0,01 cc nauwkeurig af te lezen. Nadat de gevulde kolfjes met de manometers waren verbonden, werden de kolfjes in een thermostaat bevestigd, welke electricisch op 30° C ($\pm 0,01$) verwarmd was. Gedurende het schudden (200 schommelingen per minuut) werd het kwikreservoir van de manometers zoo laag geplaatst, dat de gisting onder verminderde druk kon plaats hebben. Om het kwartier werd de schudmachine stop gezet en de volumenverandering afgelezen.

In de eerste plaats hebben wij nu nagegaan, hoe de door ons gebruikte gistsoort zich gedroeg bij toevoeging van verschil-

lende hoeveelheden gist-kooksap. Wij maakten uitsluitend gebruik van gistras „M”, een bovengist voor stokerijen, welke door het „Institut für Gärungsgewerbe” te Berlijn als mengsel van vier onderrassen voor technische doeleinden wordt gekweekt.

In de volgende tabel geven wij een voorbeeld van de versnelde gisting, welke bij toevoeging van verschillende hoeveelheden gistkooksap plaats heeft:

Tijd	Afgelezen volumens in cc				
	Blanco	Toegevoegde hoeveelheden gistkooksap			
		0,1	0,2	0,3	0,5 cc
3,45	1,24	1,78	2,24	1,88	2,44
4,00	1,80	2,54	3,18	2,90	3,40
4,22	2,68	3,86	4,80	4,92	5,54
4,35	3,40	4,72	5,90	6,30	7,10
4,45	3,82	5,32	6,62	7,18	—
	Koolzuur-productie per uur				
	2,58	3,54	4,38	5,30	5,60

Van iedere „Z-concentratie” werd dus bepaald, hoeveel koolzuur per uur werd gevormd; figuur 10 geeft het verband weer tusschen de koolzuurontwikkeling per uur en de hoeveelheid toegevoegde Z-factor.

b. Eenheden

Het was natuurlijk noodzakelijk bij de bestudeering van het Z-probleem, een eenheid voor de Z-werking vast te stellen om

de vele praeparaten met verschillend gehalte gemakkelijker met elkaar te kunnen vergelijken.

H. VON EULER en medewerkers gebruikten in het begin van hun onderzoek over factor Z een gist, welke bij toevoeging van kleine hoeveelheden Z een rechtlijnige activiteitscurve gaf. Daarbij was dus het ontwikkelde koolzuur recht evenredig met de toegevoegde hoeveelheid Z-factor en men kon hieruit de

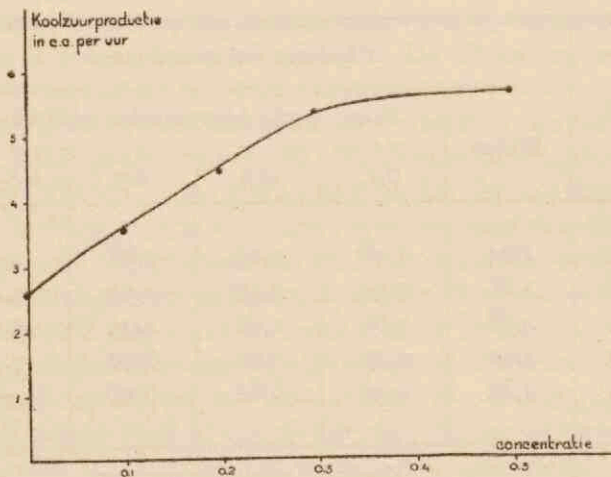


FIG. 10

activiteit der verschillende praeparaten gemakkelijk berekenen.

Later werkten v. EULER en medewerkers met een gist, waarvan de activiteitscurve een verloop had als in fig. 10 is aangegeven, dus reeds bij kleine hoeveelheden van factor Z niet rechtlijnig was; het werd dus noodzakelijk, een andere eenheid te kiezen. Zij bepaalden nu de hoeveelheid Z (in cc of mg), welke noodig was om de gist totaal te activeeren, zoodat dus verdere toevoeging van factor Z geen effect meer opleverde. De helft van deze hoeveelheid werd dan als eenheid genomen en H.A.

(halve activeering) genoemd. Wanneer de activiteitscurve van de gist altijd hetzelfde verloop had, dan zouden de activiteiten van de verschillende praeparaten inderdaad goed met elkaar te vergelijken zijn. Het staat echter vast, dat het buigpunt der curve bij verschillende metingen soms meer naar rechts, soms meer naar links verschoven is, zoodat de voor de totale activeering noodige hoeveelheden van factor Z grooter of kleiner kunnen zijn. Weliswaar wordt deze fout door v. EULER gehalveerd door de halve activeering als eenheid aan te nemen, maar toch lijkt het ons mogelijk, dat hieruit nog aanmerkelijke verschillen bij het bepalen van het Z-gehalte voortvloeien. Deze fout zou alleen kunnen worden voorkomen, door iedere dag een standaardcurve mede te bepalen, d.w.z. een reeds vroeger gemeten oplossing met een bekende hoeveelheid Z iedere dag in verschillende concentraties te meten. Het leek ons om deze redenen wenschelijk, naar een andere eenheid om te zien.

Wij nemen als eenheid (Z-E) aan die hoeveelheid van factor Z, welke in 1 uur tijd de koolzuurontwikkeling van onze gist in de reeds genoemde voedingsoplossing bij 30° C met 50% verhoogt.

Een praeparaat bijv., waarvan 10 mgr. een koolzuurontwikkeling gaven van 4,5 cc per uur, terwijl zonder toevoeging een koolzuurontwikkeling van 3 cc was verkregen, bevat dus 1 Z-E. Door op deze manier het gehalte aan factor Z uit te drukken, zijn we onafhankelijk van de verschillen in de gevoeligheid van onze gist.

c. Bios en factor Z.

In het Organisch chemisch laboratorium der Rijks-Universiteit te Utrecht stonden ons zeer zuivere praeparaten van biotine uit eigeel ter beschikking. Wij gingen nu de invloed van deze praeparaten na in verband met de Z-werking. Hiertoe werd gebruik gemaakt van het gistras „M”, dat volgens de in ons laboratorium gedane proeven, zeer gevoelig was voor bios.

Bij deze gistsoort veroorzaakten biotinepreparaten¹⁾ absoluut geen Z-werking, terwijl wij met een gewoon gistextract wel een goede versnelling der gisting konden bereiken.

Hieruit moeten wij dus concludeeren, dat de gebruikte gistsoort wel gevoelig is voor de Z-werking, maar dat deze werking niet toegeschreven kan worden aan biotine. Wij stelden ons nu tot taak, na te gaan, of er — nadat de identiteit van biotine met factor Z weerlegd was — wel een verband tusschen deze stof en een der andere biosfactoren bestaat.

Zooals reeds in Hoofdstuk III werd besproken, kunnen uit een gistextract de verschillende bios-factoren worden gescheiden door het achtereenvolgens te behandelen met lood-acetaat in basisch milieu en schudden met kool. Wij stelden ons allereerst tot doel, deze scheiding uit te voeren en na te gaan, welke van de fracties Z-werking zouden hebben. Daarvoor werd gist als volgt verwerkt:

1 kg gist (Koningsgist, Delft) werd gedurende eenige uren gekookt met ongeveer 2 l water, waarna het kooksap door centrifugeeren van het celmateriaal werd gescheiden. De oplossing werd in vacuo drooggedampt, de totale werkzaamheid van het residu bedroeg 6500 Eenheden²⁾. Dit stroopje werd opgenomen in weinig water en daarna zooveel alcohol toegevoegd, dat de oplossing 80% hiervan bevatte. Het gevormde neerslag werd afgefiltreerd en het filtraat door indampen in vacuo van alcohol bevrijd. Het residu, dat nog slechts 4100 Z-E bevatte, werd opgenomen in 2 l water, aan de oplossing een overmaat van een verzadigde oplossing van loodacetaat (± 25 g Pb (OCOCH₃)₂) toegevoegd en het gevormde neerslag afgecentrifugeerd. Het neerslag werd in 2 l water gesuspendeerd en met zwavelwaterstof van lood bevrijd; daarna werd zoo lang lucht door de op-

¹⁾ Aangezien deze zuivere biotinepreparaten ook bij groote dosering zonder Z-werking waren, leek het overbodig, ook nog het zeer kostbare gekristalliseerde biotinepreparaat van Kôgl en Tönnis voor dit doel op te offeren.

²⁾ De getallen zijn afgerond.

lossing gezogen, totdat deze vrij van zwavelwaterstof was. Het na indampen in vacuo verkregen residu was onwerkzaam. Door toevoegen van ammonia krijgt men in het centrifugaat een neerslag, dat na afcentrifugeeren op dezelfde wijze ontleed werd als het eerste neerslag. In deze fractie bedroeg het aantal Z-E slechts 700. Het filtraat van de behandeling met basisch loodacetaat werd eveneens met zwavelwaterstof volledig van lood bevrijd en daarna de zwavelwaterstof op de gewone manier verdreven. Deze oplossing, welke 3200 Z-E bevatte, werd drie maal achtereenvolgens met 25 gram kool geschud. De afgefiltereerde kool werd uitgewasschen met water en daarna geëluëerd met 5 cc geconcentreerde NH_4OH in 100 cc 60 proc. aceton (per gram kool werd 10 cc van deze oplossing gebruikt). Door indampen in vacuo werden aceton en ammonia verdreven; het verkregen residu bevatte slechts 50 Z-E. In het filtraat van de kool werden nog 3100 Z-E gevonden. Bovengenoemde resultaten hebben wij samengevat in onderstaande tabel:

Fracties	werkzaamheid
gistextract	6500 Z-E
oplosbaar in 80% alcohol.	4100 "
loodneerslag	0 "
basisch loodneerslag	700 "
loodfiltraat	3200 "
kooleluat	50 "
koelfiltraat	3100 "

Hieruit ziet men dus, dat slechts 60% van de totale hoeveelheid werkzame stof in alcohol van 80% oplosbaar is. Uit het basisch loodneerslag werd na het ontleden een fractie ver-

kregen, welke 10% van de oorspronkelijk aanwezige factor Z bevatte; dit moeten wij waarschijnlijk aan adsorptie van onze factor aan het neerslag toeschrijven en niet als eigenschap van de stof beschouwen. Wij hebben deze scheiding met loodacetaat natuurlijk eenige malen herhaald, maar moesten steeds weer een gedeeltelijk verlies van activiteit — namelijk ongeveer 10% — constateeren. Ook de werkzaamheid van het kool-eluaat moet waarschijnlijk gedeeltelijk aan adsorptie te wijten zijn, daar het grootste gedeelte van de Z-werkzaamheid — namelijk 50% — in het koolfiltraat kon worden gevonden. Wij wisten reeds uit andere onderzoekingen van dit laboratorium, dat aan deze fractie *alleen* bij „ras M” geen bioswerking kan worden toegekend, maar dat ze wel in staat is, de werkzaamheid van het kool-eluaat, dat het biotine bevat, te verhoogen. Het was echter noodzakelijk, om ook bij onze eigen fractioneerling de bioswerking van de verschillende fracties en van hun combinaties nog eens na te gaan. Wij danken Dr. Kostermans voor de bereidwilligheid, waarmee hij deze proeven voor ons heeft uitgevoerd. De metingen, welke op de in ons laboratorium gebruikelijke wijze werden verricht, toonden, dat het biotine zich grootendeels in het kool-eluaat bevond; ook kon de werkzaamheid inderdaad nog worden verhoogd door het basisch loodneerslag na ontleden aan het koolfiltraat toe te voegen. De inosiet-fractie (basisch loodneerslag) had door adsorptie van eenig biotine een kleine werkzaamheid. Het koolfiltraat alleen was absoluut onwerkzaam; ook een combinatie van koolfiltraat en basisch loodneerslag geeft geen verhoogde groei van de gist. Het kool-eluaat, dat dus de eigenlijke bioswerking toonde, had aan de andere kant haast geen Z-werking. Wij hebben toen nog nagegaan of combinaties van de fracties, welke wij bij de scheiding hadden verkregen, wel een Z-werking uitoefenden, of tenminste de Z-werking van een laag actief praeparaat konden verhoogen. Daar toe hebben wij bij het kool-eluaat, dat zelf bijna onwerkzaam is, het basisch loodneerslag gevoegd; de werkzaamheid overschreed

die van het basisch loodneerslag niet. Ook de combinatie van kool-filtraat, kool-eluaat en basisch loodneerslag gaf geen hogere werkzaamheid dan te verwachten was.

Factor Z bevindt zich dus grootendeels in het koolfiltraat, dat op zichzelf bij „ras M” geen bios-werking heeft. *Terwijl von Euler en Larsson veronderstellen, dat de door biotine resp. „bios II” veroorzaakte celvermeerdering voorbereid wordt door de geactiveerde gisting, veroorzaakt door dezelfde stoffen, komen wij door ons onderzoek — tenminste wat „ras M” betreft — tot de conclusie, dat een celvermeerdering door biotine plaats kan hebben zonder dat een geactiveerde gisting (Z-werking) voorafgegaan is.* Dat neemt natuurlijk niet weg, dat factor Z identiek zou kunnen zijn met een van de nog niet nader gekarakteriseerde bios-factoren, welke bij ons gistras als co-groeistoffen werken. Het is te hopen, dat deze vragen in niet te verre toekomst door het verder onderzoek zullen worden opgelost.

Samenvatting.

1. Een onderzoek werd ingesteld naar de werking van de auxinen op de ademhaling van *Avena sativa*, waarbij bleek, dat zoowel gekristalliseerd auxine-a als heteroauxine geen invloed hierop hebben.
2. De intensiteit van de ademhaling bij haverplantjes (*Avena sativa*) is aan dagelijksche schommelingen onderhevig.
3. Deze schommelingen loopen parallel met de door F. KÖGL en A. J. HAAGEN SMIT gevonden dagelijksche schommelingen in de gevoeligheid der haverplantjes voor auxine en eveneens met de door Bottelier gevonden schommelingen in de intensiteit der protoplasmastrooming.
4. Haverplantjes, gekweekt in cassetten van papier of metaal zijn minder onderhevig aan deze schommelingen; de ademhaling is hier intensiever en zoo goed als constant, de gevoeligheid voor auxine grooter, maar niet constant. Mogelijk is hier mede oorzaak de invloed van het gebruikte licht (oranjerood).
5. H. VON EULER heeft het vermoeden uitgesproken, dat aan de celvermeerderende werking bij gist, welke door bios II teweeg gebracht wordt, een door dezelfde stof veroorzaakte versnelling van de gisting (Z-werking) voorafgaat. Dit werd getoetst aan biotine, waarbij bleek dat biotine-praeparaten de gisting *niet* versnellen, ofschoon ze een celvermeerdering bij de gebruikte gist teweeg brengen.

Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Einfluss der Auxine auf die Atmung von *Avena sativa* studiert; hierbei ergab sich, dass weder Auxin-a noch Heteroauxin irgendwelche Veränderungen der Intensität hervorrufen.
2. Dagegen konnte festgestellt werden, dass sich die Atmungsintensität bei den Haferpflänzchen (*Avena sativa*) sowohl von Tag zu Tag als auch im Laufe eines einzigen Tages ändern kann.
3. Diese täglichen Schwankungen nehmen den gleichen Verlauf wie die von KÖGL und HAAGEN SMIT gefundenen Schwankungen in der Empfindlichkeit der Haferpflänzchen gegen Auxine. Ebenso besteht eine Parallelität mit den von BOTTELIER untersuchten Intensitätsänderungen der Protoplasmaströmung.
4. Haferpflänzchen, die in Kassetten von Papier oder Metall aufgezogen werden, zeigen die vorhin genannten Schwankungen in weit geringerem Masse. Die Atmung ist bei ihnen intensiver als bei den „normalen“ Testpflänzchen und bleibt fast konstant, während die Empfindlichkeit gegen die Auxine auch deutlich erhöht, aber nicht frei von Schwankungen ist. Möglicherweise bedeutet der Ausschluss des orange-roten Lichtes einen wichtigen Faktor für das veränderte Verhalten der Kassettenpflanzen.
5. H. VON EULER hat die Vermutung ausgesprochen, dass beim Hefewachstum der Zellvermehrung, die durch „Bios II“ verursacht wird, eine durch den gleichen Stoff bewirkte Gärungsbeschleunigung (Z-Wirkung) vorausgeht. Zur Klärung dieser Frage wurde Biotin geprüft; dabei ergab sich, dass es die Gärung *nicht* zu beschleunigen vermag, obwohl es bei der benutzten Heferasse Zellvermehrung hervorruft.

LITTERATUURLIJST

A. Over Auxine

1. J. BABIČKA, Die Wuchsstoffe.
Beih. Bot. Cent. Abt. A, Bd. LII (1934).
2. J. BONNER, J. Gen. Physiol. Vol. 17, no. 1, 63 (1933).
3. H. P. BOTTELIER, Rec. trav. botan. néerl. 31, 474 (1934).
4. P. BOYSEN-JENSEN, Die Wuchsstofftheorie.
Jena: G. Fischer 1935.
5. P. BOYSEN-JENSEN, Ber. dtsch. bot. Ges. 28, 118 (1910).
Biochem. Z. 236, 205 (1931).
" " 239, 243 (1931).
" " 250, 270 (1932).
6. H. VON EULER en H. LARSSON, H. S. 223, 189 (1934).
7. N. CHOLODNY, Jahrb. f. wissensch. Bot. 65 (1926).
Planta 6 (1928).
Ber. dtsch. Bot. Ges. 51, 85 (1933).
8. HALDANE en BARCROFT, J. of Physiol. 28, 232 (1902).
9. A. N. J. HEYN, Rec. trav. bot. néerl. 28, 113 (1934).
Proc. Acad. Wetensch. Amsterdam 33 nr. 9, (1930).
" " " " 34 nr. 3, (1931).
Jb. Bot. 79, 753 (1934).
10. F. KÖGL, A. J. HAAGEN SMIT en H. ERXLEBEN, H.S. 214, 247 (1933)
11. F. KÖGL, A. J. HAAGEN SMIT en H. ERXLEBEN, H.S. 225, 215 (1934)
12. F. KÖGL en H. ERXLEBEN, H.S. 227, 51 (1934).
13. F. KÖGL en H. ERXLEBEN, H.S. 228, 90 (1934).
14. F. KÖGL en D. KOSTERMANS, H.S. 228, 113 (1934).
15. F. KÖGL en H. ERXLEBEN, H.S. 235, 181 (1935).
16. F. KÖGL, Ber. 68, Abt. 1, 16 (1935).
Die Naturwissensch. 23, Heft. 50 (1935).
17. O. MEYERHOF, Ber. 58, 991 (1925).
18. NIELS NIELSEN, Planta 6, 376 (1928).
Jb. Bot. 72, 66 (1930).
" " 73, 125 (1930).
" " 73, 189 (1930).
Biochem. Z. 237, 244 (1931).

19. H. SÖDING, *Jahrb. Wiss. Bot.* 74, 127 (1926).
 " " " 77, 627 (1932).
 " " " 79, 231 (1934).
20. H. SÖDING, *Über Wuchshormone. Zellstimulationsforsch.* Berlin.
21. O. WARBURG, *Über den Stoffwechsel der Tumoren.* 1926 Berlin
 Verlag v. Julius Springer.
22. F. A. F. C. WENT en KOSTYTSCHEW, *Lehrbuch der Pflanzen-Physiologie* 2. Bd. S. 254.
23. F. KÖGL, H.S. 214, 261 (1933).
24. F. W. WENT, *Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam* 30, 1 (1926).
Rec. trav. bot. néerl. 25, 1 (1928).
 " " " " 25a, 483 (1928).
Jahrb. wiss. Bot. 76, 528 (1932).

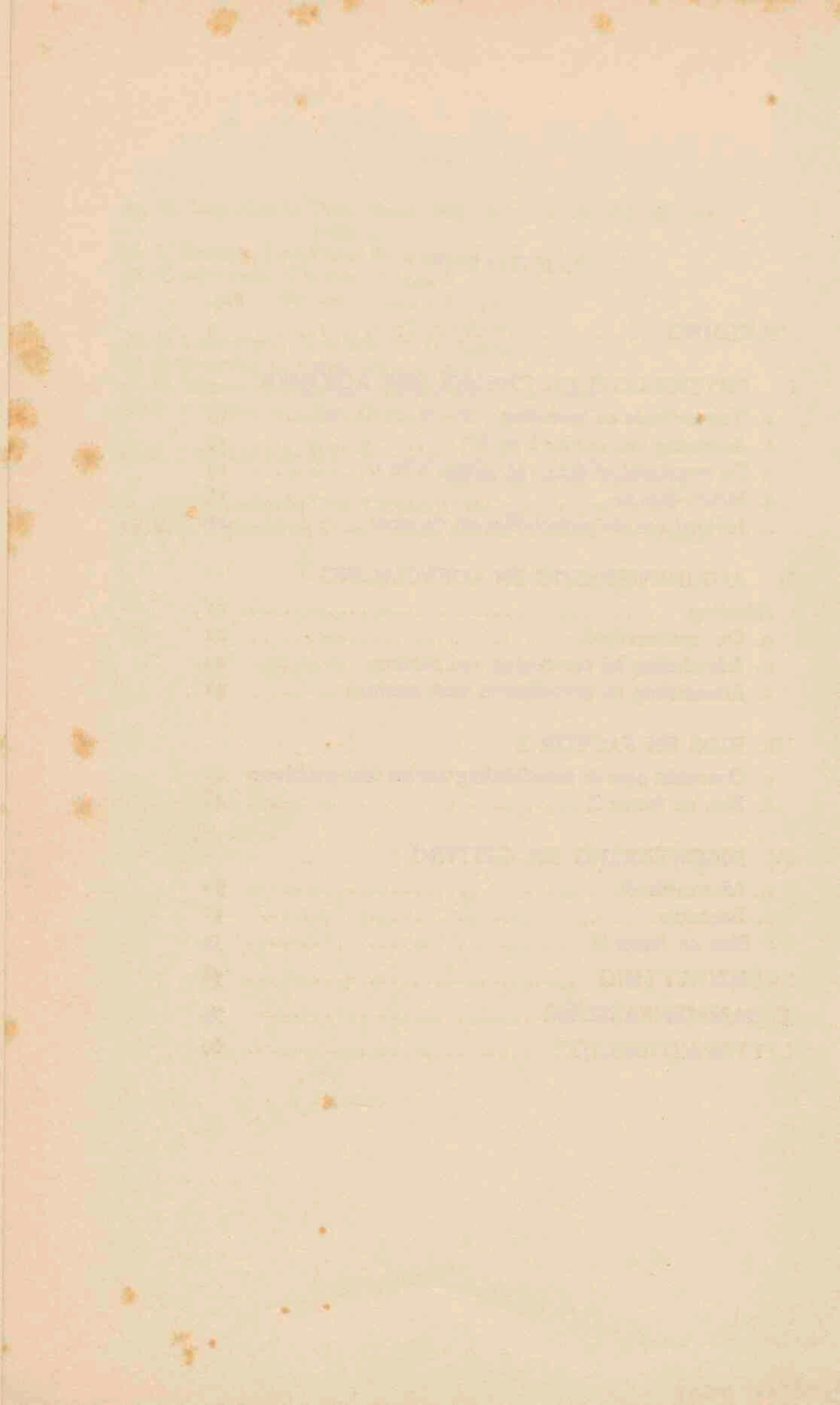
B. Over Bios en Factor Z.

25. A. M. COPPING, *Biochem. J.* 23¹¹, 2050 (1929).
26. E. V. EASTCOTT, *J. Phys. Chem.* 32, 1094 (1928).
27. A. D. EMMET en M. J. STOCKHOLM, *J. Biol. Chem.* 43, 287 (1920).
28. H. v. EULER en SWARTZ, H.S. 140, 146 (1924).
29. H. v. EULER en MYRBÄCK, H.S. 141, 297 (1924).
 H.S. 176, 258 (1928).
30. H. v. EULER, BRUNIUS en PROFFE, H.S. 178, 202 (1928).
31. H. v. EULER en LARSSON, H.S. 223, 189 (1934).
32. A. FERNBACH, *Ann. de la Brasserie et de la Distillerie* pag. 510
 (1901).
 (ook) *Wochenschr. f. Brauerei* 19, 2 (1902).
33. W. D. FLEMING, *J. Biol. Chem.* 49, 119 (1921).
34. E. J. FULMER, *J. Biol. Chem.* 57, 397 (1923).
35. W. VAN HASSELT, *Dissertatie Utrecht* 1935.
36. F. KÖGL, *Ber.* 68, Abt. A., 16 (1935).
37. F. KÖGL, *Die Naturwissensch.* 1935, 23, Heft 50.
38. F. KRÜGER, *Cent. Bakt.*, Abt. 1, 10 (1895).
39. K. KURONO, *J. Coll. Imp. Univ. Japan* 5, 305 (1915).
40. J. v. LIEBIG, *Ann. Chim. Phys.* 4de serie 23, 5 (1871).
41. G. H. W. LUCAS, *J. Phys. Chem.* 28, 1180 (1924).
42. W. LASH MILLER, *J. Phys. Chem.* 32, 1094 (1928).
43. W. LASH MILLER, *J. Phys. Chem. Education* 7, 257 (1930).
44. LASH MILLER, E. V. EASTCOTT en J. E. MACONACHIE, *Am. Soc.* 55,
 1502 (1933).
 Zie ook: *Chem. Abstr.* 27, 1649 (1933).

45. W. LASH MILLER, Proc. Trans. Roy. Soc. Canada III, 26, 165 (1932).
46. L. PASTEUR, Ann. Chim. Phys. 3de serie 58, 323 (1860).
47. T. PHILIPSON, H.S. 193, 15 (1930).
Biochem. Z. 245, 418 (1932).
" " 249, 245 (1932).
48. H. PRINGSHEIM, Cent. Bakt. 16, 111 (1906).
49. E. WILDIERS, La Cellule 18, 313 (1901).
50. W. WINDISCH, Wochenschr. f. Brauerei 19, 527 (1902).
51. R. J. WILLIAMS, J. Biol. Chem. 38, 465 (1919).
" " 42, 259 (1920).
52. R. J. WILLIAMS en E. M. BRADWAY, Am Soc. 53, 783 (1931).
Biochem. J. 28, 1887 (1934).
53. R. J. WILLIAMS en J. M. TRUESDAIL, Am. Soc. 53, 4171 (1931).
54. R. J. WILLIAMS en R. R. ROEHM, J. Biol. Chem. 87, 581 (1930).

INHOUD

	Pag.
INLEIDING	9
I. PHYSIOLOGIE EN CHEMIE DER AUXINEN	
<i>a.</i> Testmethode en bereiding	13
<i>b.</i> Isolering van auxine a en b	14
<i>c.</i> De structuurbepaling van auxine a en b	15
<i>d.</i> Hetero-auxine	16
<i>e.</i> Invloed van de groeistoffen op de plant	17
II. AUXINEWERKING EN ADEMHALING	
Inleiding	21
<i>a.</i> De meetmethode	22
<i>b.</i> Ademhaling bij toevoeging van auxinen	23
<i>c.</i> Ademhaling en gevoeligheid voor auxinen	31
III. BIOS EN FACTOR Z	
<i>a.</i> Overzicht over de ontwikkeling van het bios-probleem	40
<i>b.</i> Bios en factor Z	46
IV. BIOSWERKING EN GISTING	
<i>a.</i> Meetmethode	50
<i>b.</i> Eenheden	51
<i>c.</i> Bios en factor Z	53
SAMENVATTING	58
ZUSAMMENFASSUNG	59
LITTERATUURLIJST	60



STELLINGEN

I

Gekristalliseerd auxine-a en hetero-auxine hebben geen invloed op de ademhaling van *Avena sativa*.

J. Bonner, *J. Gen. Physiol.*, Vol. 17, no. 1, 63 (1933).

II

De symmetrische structuur van naphthaline is niet uitsluitend te bewijzen op grond van chemische reacties.

L. F. Fieser en W. C. Lothrop, — *J. Am. Chem. Soc.* 57, 1459 (1935).

III

Het is niet mogelijk, een bevredigende structuurformule voor chlororaphine op te stellen op grond van de theoretische beschouwingen van Clemo en McIlwain.

G. R. Clemo en H. McIlwain, *J. Chem. Soc.* 738 (1935)

IV

De verklaring van de estercondensatie van Scheibler is aan ernstige bedenkingen onderhevig.

F. Adickes en M. Meister, *Ber.* 68, 2191 (1935).

V

De eisch, gesteld in de wijziging van het melkbesluit (K.B. No. 311, 24 Mei 1935), dat de reductasetijd der melk niet korter mag zijn dan 2 uur, biedt nog geen volledige zekerheid omtrent de deugdelijkheid der melk.

W. Majoewsky, *Chem. Weekbl.* 33, 6 (1935).

PROLOGUE

The first part of the book is devoted to a general survey of the history of the subject, and to a discussion of the various theories which have been advanced to explain the phenomena which are observed.

The second part of the book is devoted to a detailed description of the various experiments which have been performed, and to a discussion of the results which have been obtained.

The third part of the book is devoted to a discussion of the various theories which have been advanced to explain the phenomena which are observed, and to a comparison of these theories with the results of the experiments.

The fourth part of the book is devoted to a discussion of the various theories which have been advanced to explain the phenomena which are observed, and to a comparison of these theories with the results of the experiments.

The fifth part of the book is devoted to a discussion of the various theories which have been advanced to explain the phenomena which are observed, and to a comparison of these theories with the results of the experiments.

VI

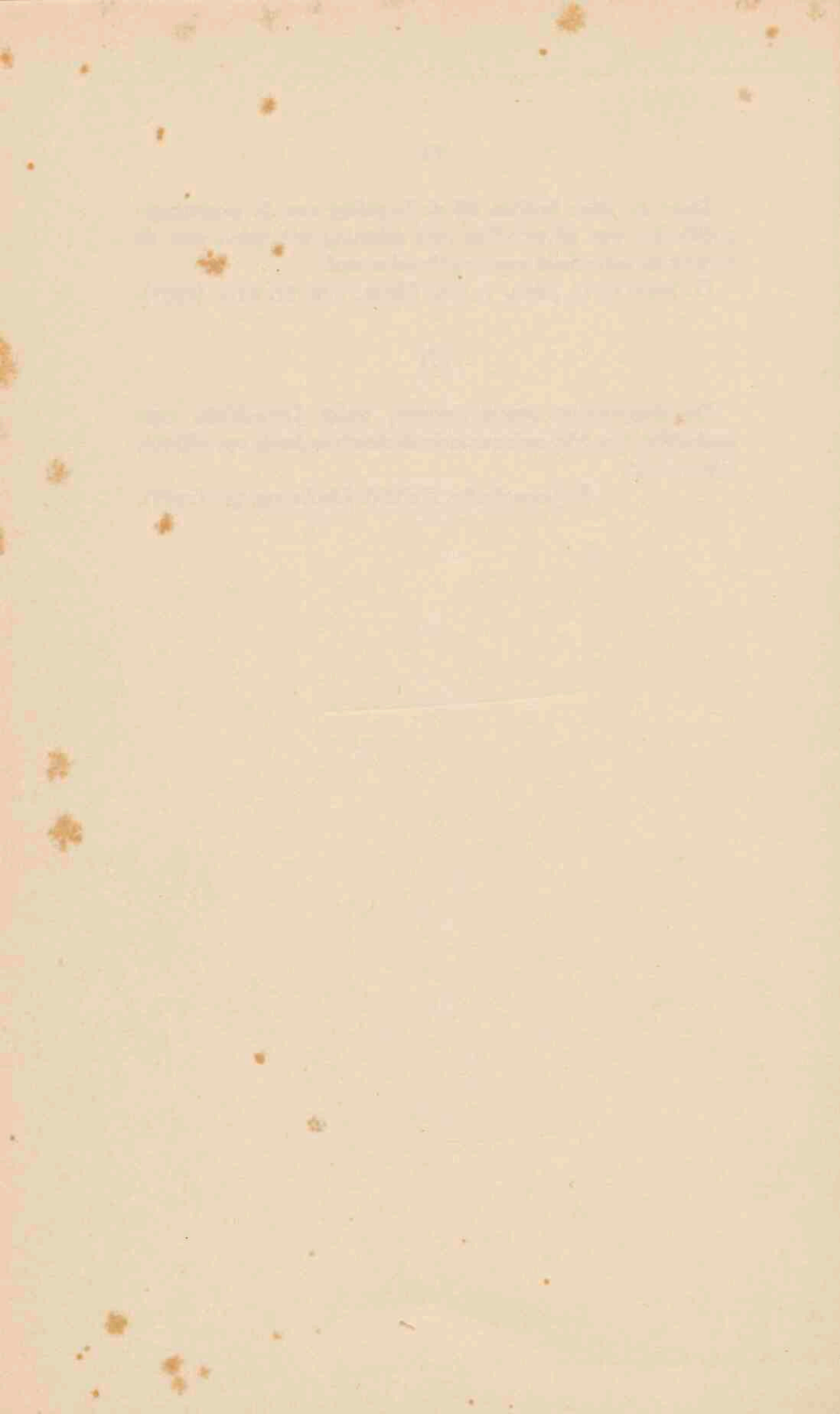
Jones en Jelen hebben bij de bepaling van de uitzettingscoëfficiënt van zilverjodide niet rekening gehouden met de fysische zuiverheid van de gebruikte stof.

G. Jones en C. Jelen, *J. Am. Chem. Soc.* 57, 2532 (1935).

VII

De theoretische beschouwingen, welke Jermolenko naar aanleiding van zijn sedimentatie-thixotropie heeft ontwikkeld, zijn onjuist.

N. Jermolenko, *Kolloid. Ztschr.* 72, 312 (1935).



Utr
19