Groei van gist en activatoren van de gisting

GROEI VAN GIST EN ACTIVATOREN VAN DE GISTING

W. A. J. BORG

GROEI VAN GIST EN ACTIVATOREN VAN DE GISTING

Diss. Utrecht 1941

GROEI VAN GIST EN ACTIVATOREN VAN DE GISTING

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. H. R. KRUYT, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP MAANDAG 9 JUNI 1941, DES NAMIDDAGS TE 4 UUR, DOOR

WILHELMUS ADRIANUS JOSEPHUS BORG

GEBOREN TE SLOTEN (N.-H.)

1941

DRUKKERIJ Fa. SCHOTANUS & JENS — UTRECHT

Aan mijn Ouders

De voltooiing van dit proefschrift, waardoor een gedeelte van mijn studietijd wordt afgesloten, biedt mij een welkome gelegenheid om U, Hoogleeraren, oud-Hoogleeraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde van harte te danken voor al datgene, wat tot mijn wetenschappelijke vorming heeft bijgedragen.

Wel in het bijzonder geldt deze dank U, Hooggeleerde KÖGL, Hooggeachte Promotor, want niet alleen Uw groote en voortdurende belangstelling in mijn onderzoek, maar ook Uw waardevolle raadgevingen en het feit, dat ik deze studieperiode als een van Uw assistenten mocht doorbrengen, stemmen mij tot groote erkentelijkheid. Daarbij zal Uw medeleven en daadwerkelijke steun in persoonlijke omstandigheden tijdens mijn afwezigheid en na mijn terugkeer op Uw Laboratorium steeds in mijn herinnering blijven voortleven.

Ook U, Hooggeleerde BIJLSMA, ben ik dankbaar voor de leiding, die U mij tijdens een deel van mijn studie hebt gegeven.

Verder wil ik hier mijn oprechten dank betuigen aan hen, die mij de studie hebben mogelijk gemaakt, terwijl ik mij tevens in denzelfden geest richt tot de leden van den wetenschappelijken staf, alsmede het geheele personeel, van het Organisch-Chemisch Laboratorium voor de medewerking en hulp, die ik steeds mocht ondervinden, waarbij ik ook hen, die ik tot mijn vrienden mag rekenen, vooral wil noemen.

HOOFDSTUK I

INLEIDING *)

Het probleem van de alcoholische gisting — al dan niet in verband met den groei van de gistcellen — heeft al sedert tientallen jaren de aandacht getrokken. Reeds Pasteur[1]) onderzocht in 1860 de ontwikkeling van gist op synthetische voedingsbodems. Daarbij werd door hem waargenomen, dat toevoeging van plantaardige stoffen of gistsappen aan een dergelijken voedingsbodem een aanzienlijke celvermeerdering en een grootere gistingsintensiteit veroorzaakte. Wel bleek later aan Wildiers[2]), dat het kweeken van gist op zuiver synthetische voedingsbodems, zooals Pasteur dit deed, onmogelijk was, tenzij er nog ruwe producten van organischen oorsprong mede aanwezig waren, zooals gistsap, vleeschextract of pepton.

Deze proefnemingen van Wildiers bevestigden de inzichten van von Liebig[3]), die reeds in 1871 de resultaten van Pasteur bestreed. Maar ook het „bios", zooals Wildiers de onmisbare stof noemde, die noodig was voor de ontwikkeling van gist, bleef nog lang het onderwerp van veel strijd. Van meer theoretischen aard waren de aanvallen van Fernbach[4]) en Windisch[5]). Zij veronderstelden, dat aan de eiwitten van het toegevoegde gistextract de anorganische zouten werden gebonden,

---

*) De gegevens voor dit overzicht zijn gedeeltelijk ontleend aan de volgende samenvattingen: F. W. Tanner, Chem. Rev. **1**, 397 (1925), W. Lash Miller, J. Chem. Educ. **7**, 257 (1930), F. Kögl en B. Tönnis, H. S. **242**, 43 (1936).

[1]) L. Pasteur, Ann. Chim. Phys. 3. Série **58**, 323 (1860).

[2]) E. Wildiers, La Cellule **18**, 313 (1901).

[3]) J. v. Liebig, Ann. Chim. Phys. 4 Série **23**, 5 (1871).

[4]) A. Fernbach, Ann. Brasserie et Destillerie **1901**, 510.

[5]) W. Windisch, Wochenschr. f. Brauerei **19**, 2 (1902).

die in de voedingsoplossingen van Wildiers giftig zouden werken. Het werk van Amand[6]) weerlegde deze opvatting volkomen, daar hij aantoonde, dat het toegevoegde bios tijdens het groeiproces werd verbruikt, terwijl Krüger[7]) bewees, dat kleine hoeveelheden metaal den groei van gist juist kunnen bevorderen.

Pringsheim[8]) behoorde ook tot de aanvallers op het biosbolwerk. Niet dat hij in gistextract de aanwezigheid ontkende van stoffen, die den groei van gist stimuleerden, maar wel kwam hij op tegen de meening, dat die stoffen onmisbaar zouden zijn voor een gewonen groei van de gistcellen. In zijn gedachtengang veronderstelde hij de cel in staat zich te kunnen wennen aan biosarme omstandigheden.

In Leuven, de school van Wildiers, werkte men intusschen staag verder aan de ontwikkeling van het bios-principe, want in 1908 bleek uit een onderzoek van Ide[9]) aldaar, dat bios-arm gegroeide cellen, zooals Pringsheim die kweekte, dermate waren verzwakt, dat toevoeging van bios geen enkel resultaat meer had.

Maar langzamerhand verminderde de oppositie tegen de biosstelling, waaraan de ontdekking van organische verbindingen, die in geringe hoeveelheden naast de normale behoefte aan gewone voedingsmiddelen, noodzakelijk zijn voor het in stand houden van het dierlijk organisme, zeker niet vreemd zal zijn geweest.

Als eerste van dat soort stoffen, die vitaminen werden genoemd, kon het anti-beriberi-vitamine, het latere vitamine B_1 of aneurine, worden geïsoleerd. En toen ook bleek, dat preparaten met een sterk antineuritische werking den groei van gist bevorderden[10]) [11]) [12]) [13]) [14]), werd zelfs verondersteld, dat bios en aneurine dezelfde verbinding was.

---

[6]) A. Amand, La Cellule **20**, 225 (1902); **21**, 329 (1904).
[7]) F. Krüger, Centr. Bakt., Abt. 1, 10 (1895).
[8]) H. Pringsheim, Centr. Bakt. **16**, 111 (1906).
[9]) M. Ide, Centr. Bakt. II, **18**, 193 (1907).
[10]) K. Kurono, J. Coll. Agr. Imp. Univ. Japan **5**, 305 (1915).
[11]) R. J. Williams, J. Biol. Chem. **38**, 465 (1919); **42**, 259 (1920).
[12]) W. H. Eddy en H. C. Stevenson, J. Biol. Chem. **43**, 295 (1920).
[13]) F. Swoboda, J. Biol. Chem. **44**, 531 (1920).
[14]) C. Funk en H. E. Dubin, J. Biol. Chem. **44**, 487 (1920).

Eenigen tijd later echter verschenen mededeelingen [15] [16] [17], dat preparaten met een sterke bios-werking in het geheel geen antineuritische werking hadden.

Weldra kwam men tot het inzicht dat bios geen enkelvoudige stof vertegenwoordigde [18] [19]. Van dien tijd dateeren ook de pogingen om uit gistextracten en andere natuurproducten de werkelijke groeistoffen te isoleeren [20] [21], terwijl tevens in 1924 door von Euler in gistextract een stof werd ontdekt, door hem factor Z genoemd, die de alcoholische gisting zeer versnelde [22], welke werking niet aan het door Harden en Young [23] in 1904 geïsoleerde, voor de gisting onontbeerlijke, coënzyme, dat door von Euler [24] cozymase werd genoemd, kon worden toegeschreven.

Het verloop van de alcoholische gisting zelf werd ook aan vele onderzoekingen onderworpen. Daarbij gelukte het Meyerhof [25] en medewerkers een reactieschema op te stellen, waardoor dit vraagstuk voor een deel is opgelost.

Wel waren door de proefnemingen van Neuberg, die reeds eerder de carboxylase had geïsoleerd als een deel van de zymase [26], in de jaren 1915 tot 1922 [27] verschillende organische stoffen, zooals α-ketocarbonzuren, aldehyden en purinederivaten, bekend

---

[15]) A. D. Emmet en M. J. Stockholm, J. Biol. Chem. **43**, 287 (1920).
[16]) W. D. Fleming, J. Biol. Chem. **49**, 119 (1921).
[17]) E. J. Fulmer, J. Biol. Chem. **57**, 397 (1923).
[18]) E. J. Fulmer en V. E. Nelson, Proc. Iowa Acad. Sci **29**, 371 (1922).
[19]) E. J. Fulmer, W. W. Duecker en V. E. Nelson, J. Am. Chem. Soc. **46**, 723 (1924).
[20]) G. H. W. Lucas, J. Physic. Chem. **28**, 1180 (1924).
[21]) E. V. Eastcott, J. Physic. Chem. **28**, 1194 (1924).
[22]) H. v. Euler en O. Swartz, H. S. **140**, 146 (1924).
[23]) A. Harden en W. J. Young, J. of Physiol. 32 Proc. physiol. Soc. Nov. 1904.
[24]) H. v. Euler en K. Myrbäck, H. S. **131**, 180 (1923).
[25]) O. Meyerhof, Helv. Chim. Acta **18**, 1030 (1935);
O. Meyerhof, W. Kiessling en W. Schulz, Biochem. Z. **292**, 25 (1937).
[26]) C. Neuberg en H. Wastenson, Sitzungsber. d. Berl. Physiol. Ges. 20 Jan. 1911.
[27]) C. Neuberg en M. Sandberg, Biochem. Z. **125**, 202 (1921); **126**, 153 (1921) en vroegere publicaties.

geworden, die zoowel de celvrije als de gewone alcoholische gisting sterk bevorderden.

De benoodigde hoeveelheden waren echter groot (20 % van de gebruikte hoeveelheid gist), zoodat die verbindingen zeker niet verantwoordelijk konden worden gesteld voor de werking van de verschillende natuurproducten. Een ingrijpen in het normale gistingsverloop door α-ketozuren en aldehyden is dan ook waarschijnlijk, daar gistende suikermengsels het vermogen bezitten om α-ketozuren af te breken tot de overeenkomstige aldehyden, die weer tot de desbetreffende alcoholen worden gereduceerd, op welk verschijnsel de thans gebruikelijke biochemische hydreeringen berusten [28]). Wat de activiteit van de purinederivaten betreft, moet worden vermeld, dat Neuberg voor al zijn proeven een medium gebruikte, dat noch anorganisch noch organisch gebonden stikstof bevatte, vandaar dat voor dergelijke verbindingen een werking als stikstofbron niet mag worden uitgesloten.

Vooral ten aanzien van de groeistoffen werd het bios-vraagstuk op verschillende laboratoria energiek ter hand genomen. Zoo ook in het Organisch Chemisch Laboratorium te Utrecht [29]), alwaar dit sinds 1932 in samenhang met het auxine-onderzoek [30]) een onderwerp van nadere studie vormde.

Tegelijkertijd werd in laatstgenoemd instituut het onderzoek aangevat naar den gistingsfactor, die in gistkooksap aanwezig is [31]).

Zooals hierboven reeds kort vermeld, beschrijft von Euler de werking van factor Z als niet identiek met die van de al eerder bekende cozymase. Dit werd nogmaals bevestigd door het onderzoek van von Euler en Myrbäck [32]), toen werd aangetoond, dat zuivere cozymase de gisting niet versnelde.

In een verdere publicatie van von Euler [33]) werd vermeld, dat factor Z in een 80 %-ige alcohol-oplossing niet wordt neergeslagen (cozymase is in 70 %-ige alcohol geheel onoplosbaar);

---

[28]) F. G. Fischer, Fortschr. der Chemie Org. Naturstoffe III, 30 (1939).
[29]) F. Kögl en B. Tönnis, H. S. **242**, 43 (1936).
[30]) F. Kögl, A. J. Haagen Smit en H. Erxleben, H. S. **214**, 247 (1933) en **225**, 215 (1934).
[31]) C. J. van Hulssen, Dissertatie Utrecht 1936.
[32]) H. v. Euler en K. Myrbäck, H. S. **141**, 297 (1924).
[33]) H. v. Euler en K. Myrbäck, H. S. **176**, 258 (1928).

evenmin werd met bariet een scheiding verkregen. Tegelijkertijd werd de Z-werking nagegaan van verbindingen, die bij de stofwisseling van hoogere diersoorten een rol spelen, zooals tryptophaan en histidine. In hoeveelheden van 100 γ tot 10 mg per cm^3 was het resultaat negatief; hetzelfde werd vermeld van mengsels niet nader genoemde aminozuren. De geringe werking van hexosemono- en -diphosphorzuur sloot eveneens een identiteit met factor Z uit.

Behalve de beschrijving van de testmethode, die in het verdere gedeelte van dit proefschrift nog uitvoerig wordt behandeld, kon in een ander artikel reeds een methode voor de isoleering van een preparaat met een achtmaal zoo sterke Z-werking als die van gistkooksap worden gegeven [34].

Ongeveer tegelijkertijd deelde von Euler mede, dat uit vrijwel alle dierlijke organen extracten konden worden verkregen met een soortgelijke werking als die van Z-preparaten uit gist [35]. Glycerine of glycerinephosphaat waren geheel onwerkzaam, maar meso-inosiet (bios I) vertoonde een niet te verwaarloozen effect [36].

Dat factor Z geen invloed heeft op de ademhaling van de gist, werd aangetoond door Meyerhof en Iwasaki [37], die tevens meenden dat de gistingstimuleerende substantie voortdurend in de cel wordt gevormd en in het substraat diffundeert. Ook toonden Myrbäck en Larsson [38] later aan, dat het Z-effect zoowel bij de aerobe als bij de anaerobe gisting optreedt.

Daar het ook niet mogelijk bleek, factor Z neer te slaan met phosphorwolfraamzuur of lood-, kwik- en zilverzouten, kwam Philipson [39] er toe te onderzoeken of het antineuritische vitamine misschien als de gistingsfactor werkzaam was. Door het toepassen van de scheidingsmethode volgens Kinnersley en Peters [40] werd bewezen, dat vitamine B_1 niet identiek was met factor Z.

---

[34]) H. v. Euler, E. Brunius en S. Proffe, H. S. **178**, 202 (1928).

[35]) H. v. Euler en H. Johansson, H. S. **178**, 215 (1928) en Sv. kem. Tidskr. **40**, 209 (1928); C. 1928, II, 1905.

[36]) H. v. Euler en H. Johansson, geciteerd door T. Philipson, H. S. **193**, 16 (1930).

[37]) O. Meyerhof en K. Iwasaki, Biochem. Z. **226**, 16 (1930).

[38]) K. Myrbäck en H. Larsson, Biochem. Z. **258**, 118 (1933).

[39]) T. Philipson, H. S. **193**, 15 (1930).

[40]) H. W. Kinnersley en R. A. Peters, Biochem. J. **21**, 777 (1927).

De verdere resultaten van dit onderzoek kwamen niet overeen met die van von Euler, daar Philipson als bios I de celvermeerderingsfactoren isoleerde, terwijl zijn bios II alleen Z-activiteit vertoonde.

Von Euler en Philipson[41]) onderzochten eveneens kleine hoeveelheden van verschillende purinederivaten op een eventueele Z-werking, maar een dergelijk effect bleef volkomen achterwege. Ook plantaardig materiaal werd onderzocht, dat met uitzondering van een moutextract, vrijwel geen — althans weinig — Z-factoren bevatte.

Verder kwamen von Euler en Philipson tot de overtuiging, dat factor Z ook uit verschillende componenten bestaat, daar het gelukte met behulp van metaalhydroxyden verschillend actieve fracties te isoleeren. Ook werd in urine een actieve Z-verbinding aangetoond[34]) [42]).

Von Euler gebruikte voor zijn proefnemingen altijd een versche bovengist, want reeds in 1924 stelde hij vast, dat gedroogde gist door factor Z niet wordt geactiveerd[32]).

In 1933 verscheen er echter de reeds genoemde publicatie van Myrbäck en Larsson, waarin een Z-werking op gedroogde gist wordt beschreven, hetgeen een invloed van factor Z op de zymase zou beteekenen[38]). Het is echter mogelijk, dat de nog in gedroogde gist aanwezige levende cellen[43]) voor het Z-effect hebben zorggedragen; daar door Myrbäck en Larsson geen bijzonderheden omtrent de gebruikte gedroogde gist worden gegeven, blijft het verschijnsel van de door factor Z geactiveerde gedroogde gist een onopgelost vraagstuk, dat vooral van belang is in verband met de veronderstelling, dat factor Z een invloed heeft op de permeabiliteit van den gistcelwand, zooals dit reeds door von Euler werd verondersteld[33]).

Uit de verdere, in 1934 gepubliceerde, resultaten van von Euler en Larsson[44]) bleek, dat zij door het toepassen van

---

[41]) H. v. Euler en T. Philipson, H. S. **195**, 81 (1931).

[42]) H. v. Euler en T. Philipson, H. S. **198**, 1 (1931) en Biochem. Z. **249**, 245 (1932).

[43]) W. Hennenberg, Handbuch der Gärungsbakteriologie Berlin 1926, en wel deel I, pag. 332.

[44]) H. v. Euler en H. Larsson, H. S. **223**, 189 (1934).

de scheidingsmethode van Lucas[45]) uit een gistextract een fractie verkregen, die bios I (meso-inosiet) bevatte, welke geen Z-werking vertoonde en slechts een geringe celvermeerdering veroorzaakte. De andere fractie bleek zoowel bios II als factor Z te bevatten. Dit was weer niet in overeenstemming met de vroegere ondervindingen van Philipson, want ook na verdere chemische bewerkingen vertoonden de fracties, waarin het bios II voorkwam, steeds een sterk stimuleerende werking op het verloop van de alcoholische gisting. Vandaar dat von Euler tot de gevolgtrekking kwam dat factor Z en bios II identiek zouden zijn.

De werking van factor Z = bios II op gist zou dan in twee phasen moeten verloopen, waarvan de eerste merkbaar was door een gistingsversnelling, gepaard gaande met een opbouw van stoffen, die in de tweede phase aanleiding gaven tot celvermeerdering.

Maar een meer dan achtvoudige vermeerdering van factor Z in een gistpreparaat bereikte von Euler ook toen nog niet[46]).

Wel vermeldden korten tijd later Borchardt en Pringsheim[47]), dat zij met behulp van aether- en alcoholextractie, gevolgd door een zilvernitraatbehandeling een honderdvoudige concentreering van factor Z hadden bereikt. Maar ook dit onderzoek helderde nog niet de samenstelling van factor Z op.

Gelijktijdig hadden de onderzoekingen van Kögl en Tönnis[48]) [29]), uitgaande van eenden eigeel, geleid tot de isoleering van een zeer werkzamen bios-factor, die biotine werd genoemd, welke ook in gist werd aangetoond. Tevens gelukte het Kögl en van Hasselt[49]) bios-factor I, meso-inosiet, uit gist af te zonderen. Het bleek echter spoedig, dat de twee gekristalliseerde stoffen, meso-inosiet en biotine, niet voor de volledige groeiwerking van een gistextract aansprakelijk waren. Wel werd door van Hasselt aangetoond, dat de ontbrekende stoffen slechts een co-werking hadden. Want weliswaar werd de groei,

---

[45]) G. H. W. Lucas, J. Phys. Chem. **28**, 1180 (1924).

[46]) H. v. Euler, D. Burström en G. Günther, Svensk. Kem. Tidskr. **46**, 250 (1934); C. 1935 I, 2388.

[47]) H. Borchardt en H. Pringsheim, Bull. Soc. Chim. biol. **16**, 736 (1934).

[48]) F. Kögl, Ber. **68**, Abt. A, 16 (1935).

[49]) W. v. Hasselt, Dissertatie Utrecht 1935.

door biotine en meso-inosiet veroorzaakt, vergroot, maar zonder toevoeging van laatstgenoemde verbindingen groeide de gebruikte gist niet. Het aneurine bleek een gedeelte van de co-werking te kunnen uitoefenen. Niet alleen door dit onderzoek werd bewezen, dat bios II in verschillende factoren te splitsen moet zijn, maar ook Lash Miller[50]) toonde het aan. Volgens laatstgenoemden auteur scheen de samenstelling van bios II A te wijzen op een oxyaminoboterzuur[51]); het bios II B kon aan kool worden geadsorbeerd.

Korten tijd later gaf Lash Miller[52]) voor bios II A de volgende samenstelling: β-alanine, l-leucine en bios V. Verder was uit tomatensap een verbinding met tannine neer te slaan, waarvan een goed gekristalliseerd koperzout werd verkregen, dat zich gedroeg als dat van een oxyaminozuur[53]), hetwelk echter *niet* identiek is met threonine, dat volgens een onderzoek van Rose[54]) als een onmisbaar voedselbestanddeel voor de groei van ratten werd vastgesteld. Bios V werd in 1936 geïdentificeerd als aneurine[55]).

Door electrodialyse van de meest verschillende plantaardige en dierlijke extracten ontdekte Williams[56]) een stof, door hem pantotheenzuur genoemd, die op vele gistsoorten slechts een co-werking uitoefende, maar zeer sterk als groeifactor werkzaam is op de door hem gebruikte „Gebrüder Mayer"-gist. Ook bleek het pantotheenzuur eenigszins in staat de gisting te stimuleeren

---

[50]) W. Lash Miller, E. V. Eastcott en J. E. Maconachie, J. Am. Chem. Soc. **55**, 1502 (1933).

[51]) W. Lash Miller, E. V. Eastcott en E. M. Sparling, Trans. Roy. Soc. Canada III (3) **26**, 165 (1932); C. 1933 I, 3463.

[52]) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada III (3) **30**, 99 (1936); C. 1937 I, 3003.

[53]) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada III (3) **29**, 163 (1935); C. 1936 I, 3359.

[54]) R. H. Mc Coy, C. E. Meyer en W. C. Rose, J. Biol. Chem. **112**, 283 (1935) en **115**, 721 (1936).

[55]) W. Lash Miller, Trans. Roy. Soc. Canada III (3) **31**, 159 (1937).

[56]) R. J. Williams en J. H. Truesdail, J. Am. Chem. Soc. **53**, 4171 (1931).

evenals β-alanine en aethanolamine [57]). Na verloop van eenige jaren is de constitutie van het pantotheenzuur geheel opgehelderd, terwijl ook de synthese is gelukt [58]).

Bij het vergelijken van de verschillende onderzoekingen valt het direct op, dat een factor, die zeer actief werkt bij de proefnemingen van een bepaalden auteur, in een ander laboratorium slechts een matige of een co-werking vertoont. Dit behoeft geenszins verwondering te wekken, daar bij vergelijkende onderzoekingen met verschillende gistrassen reeds vroeger is gebleken [59]), dat de behoefte aan bios-factoren totaal verschillend kan zijn. Wilde gisten kunnen zich op vrijwel synthetische voedingsbodems normaal ontwikkelen.

Een recent voorbeeld van een dergelijk verschil in activiteit ten opzichte van verschillende gistsoorten, geeft de quantitatieve aneurinebepaling met Fleischmann bakkersgist, zooals die werd voorgesteld en uitgewerkt door Schultz en zijn medewerkers [60]), waarvan door Heyns [61]), die dezelfde methode nog verder heeft onderzocht, werd aangetoond, dat juist Fleischmann gist zeer sterk op kleine hoeveelheden aneurine reageert, terwijl andere, niet met name genoemde gistsoorten, slechts een gering effect vertoonen.

Dit overzicht zou zeker niet compleet zijn, als vitamine B_6, adermine, onvermeld bleef, want Schultz [62]) heeft een werking van adermine op de groei en gisting waargenomen, terwijl ook Williams [63]) tegelijkertijd de beteekenis van vitamine B_6 be-

---

[57]) R. J. Williams, W. A. Mosher en E. Rohrman, Biochem. J. **30**, 2036 (1936).
R. J. Williams en E. F. Pratt, Science **89**, 200 (1939).

[58]) R. J. Williams, Science **91**, 246 (1940).

[59]) A. M. Copping, Biochem. J. **23 II**, 1050 (1929).

[60]) A. Schultz, L. Atkin en C. N. Frey, J. Am. Chem. Soc. **59**, 948, 2457 (1937) en **60**, 1514, 3084 (1938).
A. Schultz, L. Atkin en C. N. Frey, Science **88**, 547 (1938).
R. J. Williams en E. F. Pratt, Science **89**, 200 (1939).
L. Atkin, A. Schultz en C. N. Frey, J. Biol. Chem. **129**, 471 (1939).

[61]) K. Heyns, H. S. **258**, 219 (1939).

[62]) A. Schultz, L. Atkin en C. N. Frey, J. Am. Chem. Soc. **61**, 1931 (1939).

[63]) R. J. Williams en R. E. Eakin, J. Am. Chem. Soc. **61**, 1932 (1939).

schreef als groeifactor. Dit vitamine is later zoowel door Kuhn[64]) als door Harris[65]) gesynthetiseerd.

Tenslotte willen wij dan nog wijzen op enkele artikelen, waarin vooral de gisting aan een nader onderzoek werd onderworpen. Hartelius[66]) kon, door een gistextract te schudden met gist, het bios-gehalte verminderen tot op 8 %, terwijl de Z-werking voor 50 % behouden bleef, waarbij hij nog vermeldde, dat de uitgeschudde Z-actieve stoffen niet te vervangen waren door β-alanine of andere, niet nader genoemde aminozuren.

Runnström[67]) zoekt de oplossing van het Z-probleem in een permeabiliteitskwestie, daar de remmende werking van toegevoegd fluoride des te sneller verloopt, naarmate de gisting is geactiveerd door factor Z-preparaten.

De publicaties van Lieben[68]) kunnen worden gezien als een vervolg op het nog verder voortgezette, reeds vermelde, onderzoek van Neuberg[27]) [69]), waarbij bleek, dat ook aminozuren gistingstimuleerend konden optreden, waarvoor hij onder andere de decarboxyleering van het aminozuur aansprakelijk stelde. Lieben onderzocht de werking van glycocol, alanine en histidine, die, zonder toevoeging van andere N-bronnen, een gelijke activeering van de gisting teweeg brachten. Hij vermoedde, dat een voorbijgaande reactie plaats had tusschen suiker en aminozuur, zooals Neuberg deze heeft waargenomen bij een fructoseoplossing, waarvan het linksdraaiend vermogen sterk vermeerderde, zoodra bij kamertemperatuur dl-alanine werd toegevoegd. Maar ook hier was een optreden van het aminozuur als N-bron niet uitgesloten.

Op alle verdere literatuur over factor Z en gistingsstimuleering

---

[64]) R. Kuhn, K. Westphal, G. Wendt en O. Westphal, Naturwiss. **27**, 469 (1939).

[65]) S. A. Harris en K. Folkers, J. Am. Chem. Soc. **61**, 1245 (1939).

[66]) V. Hartelius en N. Nielssen, Biochem. Z. **298**, 125 (1938).

[67]) J. Runnström, E. Sperber en E. Karlsson, Arkiv för Kemi, Min. o. geol. **13 B**, No. 10, 1 (1939).

[68]) F. Lieben en B. Bauminger, Biochem. Z. **279**, 321 (1935) en vroegere publ.

[69]) C. Neuberg en M. Kobel, Biochem. Z. **162**, 496 (1925).

willen wij hier niet ingaan; daarvoor verwijzen wij den lezer naar de oorspronkelijke publicaties [70]).

Zooals hierboven reeds kort vermeld, werd het onderzoek naar factor Z ook in het Organisch Chemisch Laboratorium te Utrecht ter hand genomen.

De isoleering van biotine door Kögl en Tönnis [48]), gaf aan van Hulssen [31]) de gelegenheid om dezen bios-factor te testen op een Z-werking. Hij ging daarbij te werk volgens de methode van von Euler, waarbij de koolzuurontwikkeling van een phosphaat-glucoseoplossing, waarin een bepaalde hoeveelheid gist was gesuspendeerd, werd bepaald zonder en bij aanwezigheid van factor Z [36]) [44]). Als gist werd gekozen Ras M, een bovengist, die van het „Institut für Gärungsgewerbe" te Berlijn destijds wekelijks per vliegpost werd ontvangen. Deze gist had zich bij de biotine-isoleering als zeer bruikbaar getoond voor de bepaling van de activiteit der fracties [71]).

In principe kwam de testmethodiek overeen met de werkwijze, die in een volgend hoofdstuk uitvoerig zal worden beschreven. Daarom willen wij thans volstaan met te vermelden, dat de voedingsoplossing 5 % glucose en 0,5 % phosphaatmengsel bevatte. Nadat gedurende 60 minuten was geschud bij 30°, werd de koolzuurontwikkeling in het volgende uur manometrisch bepaald.

Om de verkregen resultaten en de verschillende fracties te kunnen vergelijken, was het wenschelijk een Z-eenheid in te voeren.

Von Euler [34]) stelde voor als eenheid de helft van de minimum hoeveelheid stof, die noodig is om de grootst mogelijke koolzuurontwikkeling te verkrijgen van 50 mg gist in een suiker-

---

[70]) H. Zeller, Biochem. Z. **266**, 360 en 367 (1933) en vroegere med.
K. Zipf en K. Rathert, Biochem. Z. **275**, 90 (1935).
J. Hanak en L. Schwarz, Chem. Obzor **10**, 81 (1935); C. 1935 II, 2966.
A. Lasnitzki en E. Szörenyi, Biochem. J. **29**, 580 (1935).
J. Dadlez en W. Kokowski, Biochem. Z. **283**, 292 (1936).
R. Guillement, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. **201**, 1517; C. 1936 I, 3702.
R. Geoffrey en G. Labour, Bull. Soc. Chim. biol. **19**, 922 (1937); C. 1938 II, 4258.

[71]) L. Pons, Dissertatie Utrecht 1938.

phosphaatoplossing van constante samenstelling. Een op die wijze gestandaardiseerd preparaat vertoonde echter in de meeste gevallen bij een nieuwe gistzending een andere activiteit. Daarom was het begrijpelijk, dat naar een andere eenheid werd gezocht, waarbij de wisselende gevoeligheid van de gist zooveel mogelijk werd uitgeschakeld. Daar de ontwikkelde hoeveelheid koolzuur bij een activeering van nul tot ongeveer honderd procent recht evenredig was met de aanwezige hoeveelheid Z-factor, kon van Hulssen[31]) als Z-eenheid kiezen die hoeveelheid stof, die in een proef gedurende een uur de koolzuurontwikkeling van 50 mg gist in een voedingsoplossing van constante samenstelling bij 30° met 50 % verhoogde ten opzichte van een tegelijkertijd uitgevoerde test met eenzelfde hoeveelheid gist zonder toevoeging van een actief preparaat. In een paar voorproeven werd waargenomen, dat ook gistras M op toevoeging van gistkooksap reageerde met een grootere koolzuurontwikkeling.

Zuivere biotinepreparaten bleken echter totaal geen Z-werking uit te oefenen. In het onderzoek, dat later door Erxleben werd voortgezet, gelukte het, uitgaande van gistkooksap of Marmite, een 10.000-voudige concentreering van een Z-factor te verkrijgen[72]). Helaas bleek later dit effect niet meer te reproduceeren, hetgeen zeer waarschijnlijk moest worden geweten aan technische wijzigingen in de kweekmethode van de gebruikte gist bij het „Institut für Gärungsgewerbe", die juist destijds plaats vonden. Ook bestaat de mogelijkheid, dat een zeer snel werkende bios-factor werd geïsoleerd, die in korten tijd reeds een dergelijke celvermeerdering veroorzaakte, welke invloed had op de koolzuurproductie.

De pogingen om een gist te verkrijgen, gelijk aan het vroegere ras M, bleven vruchteloos. Dit was de reden, waarom toen naar een geheel andere testmethode werd gezocht.

In dit stadium van het onderzoek werd het mijn taak, een goede testmethode voor factor Z uit te werken, waardoor het Z-probleem nader tot een oplossing zou kunnen worden gebracht.

---

[72]) F. Kögl, Naturwiss. **1937**, 468.

HOOFDSTUK II

DE TESTMETHODE

In het laboratorium van I d e te Leuven werd het bios-vraagstuk verder bestudeerd met behulp van een testmethode [73]), waarbij de gisting als maat voor de toegevoegde hoeveelheid bios-factor gold.

In het kort was de werkwijze aldaar als volgt:

Een voedingsoplossing van de samenstelling *):

water tot	1	liter
K_2HPO_4	5	gram
Na_2HPO_4	5	„
$MgSO_4$	5	„
NH_4Cl	5	„
$CaCO_3$	1	„
saccharose	80	„

werd per 125 cm^3 geënt met ongeveer 400.000 gistcellen, een hoeveelheid, die zonder toevoeging van bios-verbindingen, zich niet kon vermeerderen, waardoor een meetbare koolzuurontwikkeling achterwege bleef.

De kolfjes werden afgesloten met U-vormige glazen buisjes, gevuld met geconcentreerd zwavelzuur, waardoor het koolzuur kon ontwijken, maar de meegevoerde waterdamp werd geabsorbeerd.

Het groei- en gistingsproces geschiedde in een broedstoof bij 30°, terwijl de kolfjes eenmaal daags werden gewogen.

Als een bios-factor werd beschouwd een of andere verbinding, die bij toevoeging aan de voedingsoplossing, na 3 tot 4 dagen een duidelijke koolzuur-ontwikkeling deed ontstaan.

Het leek nu de moeite waard om na te gaan of door toevoeging van een Z-preparaat een snellere gisting kon worden verkregen, want de gisting speelt natuurlijk als een van de beide energie-

---

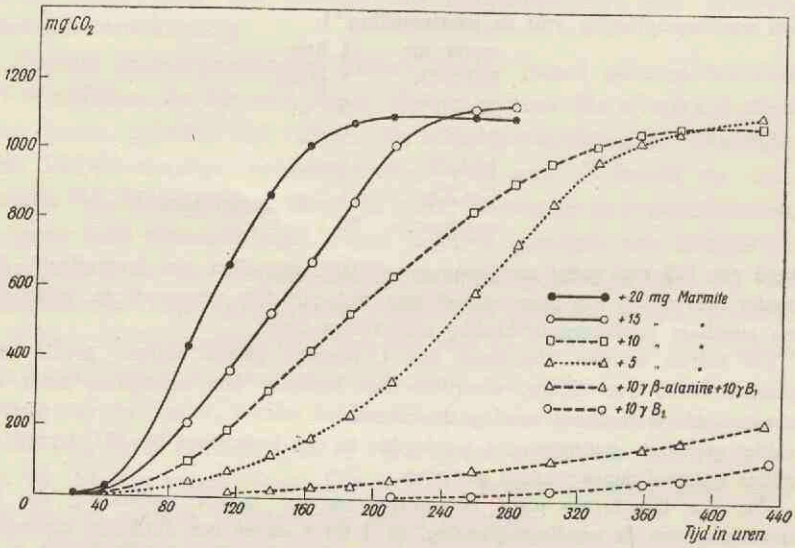
[73]) R. D e v l o o, La Cellule **23**, 363 (1906).

*) De gebruikte chemicaliën waren van de kwaliteit „pro analysi".

bronnen ook bij de vermeerdering van de gistcellen een grooten rol, alhoewel de ervaring leert, dat de betrekkingen tusschen gisting en celvermeerdering — afhankelijk van de gebruikte gist en haar kweekmethode — zeer verschillend kunnen zijn [43]).

Allereerst werd onderzocht de werking van gistkooksap, waardoor een afzonderlijke toevoeging van groeistoffen overbodig was. Wij gebruikten voor al onze proeven een geconcentreerd gistkooksap, dat onder den naam „Marmite" van de Marmite Food Extract Co. London in den handel verkrijgbaar is.

Aan 30 cm³ voedingsoplossing van de hiervoor genoemde samenstelling, in kolfjes van ongeveer 50 cm³, werd één cm³ van een Marmite oplossing toegevoegd. Nadat de kolfjes met een wattenprop waren afgesloten, volgde sterilisatie bij 100° gedurende 30 minuten, hetgeen na twee dagen nog eens werd herhaald.



Figuur 1

Het gistingsverloop van een I d e-test met toevoeging van Marmite (gistkooksap), aneurine en β-alanine

Als gist werd gebruikt ras 1100, een W i l d i e r s-gist, die werd gekweekt in steriele bierwort. Door verdunnen met steriel water ontstond een suspensie, die per druppel ongeveer 100.000 cellen bevatte.

Het enten geschiedde door aan den inhoud van elk kolfje een druppel van bovengenoemde suspensie toe te voegen; tegelijkertijd werd de zwavelzuurafsluiting aangebracht. Nadat de kolfjes waren gewogen, werden deze in een broedstoof bij 25° geplaatst. Daarna had telkens na ongeveer 24 uur gewichtscontrôle plaats.

De testen werden verschillende malen herhaald, waarbij bleek, dat de verkregen waarden een goede overeenstemming vertoonden.

In figuur 1 zijn de resultaten weergegeven van dergelijke proeven met toevoegingen van 5 tot 20 mg Marmite. (Minder dan 5 mg gaf een zeer onregelmatig resultaat, waarom wij deze hoeveelheid als een grenswaarde beschouwden.) Tegelijkertijd is in deze figuur opgenomen het verloop van de koolzuurontwikkeling wanneer als groeistoffen zijn toegevoegd aneurine en β-alanine in hoeveelheden van 10 γ.

Uit het verloop van de krommen was nu op eenvoudige wijze af te leiden, dat, ongeacht de toegevoegde hoeveelheid Marmite, de waarneembare koolzuurontwikkeling vrijwel op hetzelfde tijdstip begint, namelijk na ongeveer 25 uur. Wel verloopt daarna de gisting sneller naarmate er meer Marmite aanwezig is. Of dit aan een snellere groei der cellen of aan een factor Z-werking moest worden toegeschreven, was aan de hand van deze proeven niet vast te stellen.

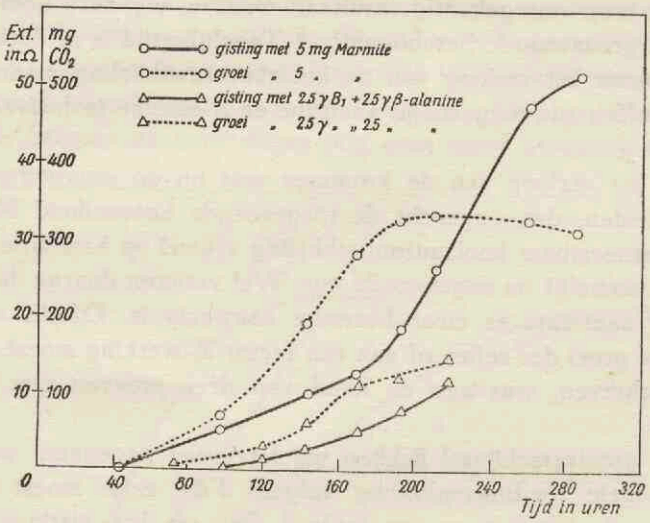
Het groeiverschijnsel hebben wij later wel nagegaan, waarvoor de troebele voedingsoplossing volgens I d e eerst moest worden gefiltreerd, hetgeen zonder invloed was op het gistingsverloop.

Eerst willen wij echter vermelden, dat de chemisch zuivere verbindingen β-alanine, nicotinezuuramide en asparaginezuur, alleen of in combinatie, geen effect in de I d e-test teweeg brengen, dus ook geen groei. Dit was wel het geval met aneurine, maar pas na ongeveer 200 uur, welke tijd door toevoeging van β-alanine tot de helft kon worden bekort.

Het was opvallend dat, wanneer er gisting optrad, de geproduceerde hoeveelheid koolzuur per tijdseenheid voor elke test afzonderlijk spoedig een constante waarde kreeg, zooals uit het rechtlijnige verloop der krommen in figuur 1 is te zien. Dit zou er op kunnen wijzen, dat de celvermeerdering op een bepaald punt tot stilstand kwam, of dat de celvermeerdering gelijken tred hield met het afsterven van oude cellen.

Door middel van nephelometrische bepalingen is het groeiproces te volgen. Daar dit soort metingen al sinds jaren in ons laboratorium wordt verricht bij de uitvoering van de biotinetest met behulp van een nephelometer volgens Moll[74]), die reeds uitvoerig door Pons[71]) is beschreven, zal hier op het meetinstrument zelf niet nader worden ingegaan.

Het resultaat van een dergelijke groei- en gistingsbepaling is in de volgende figuur weergegeven:



Figuur 2

Het groei- en gistingsverloop van een Ide-test

De werkwijze voor deze bepalingen was als volgt: een serie kolfjes met 15 cm³ voedingsoplossing volgens Ide maar gefiltreerd en 0,5 cm³ van de te testen oplossing werd met gist 1100 geënt, daarna gewogen en vervolgens in een schudthermostaat bij 25° geplaatst. Het gewichtsverlies aan CO_2 werd dagelijks door wegen bepaald. Telkenmale werd dan een kolfje uit de serie genomen voor een nephelometrische bepaling. Daartoe werd 0,9 cm³ van de goed geschudde gistsuspensie gepipetteerd in 20 cm³ van een 0,1 %-ige chloor-

---

[74]) W. J. H. Moll, Versl. Akad. Wetensch. Amsterdam 28, 1001 (1919—1920).

kresol oplossing, waarin de gist direct afsterft. Deze bepalingen alsook alle andere proeven van het geheele onderzoek werden minstens in duplo uitgevoerd *).

Uit het verloop van de krommen was duidelijk te zien, dat, zoodra de extinctie een waarde hooger dan die van de blancoproeven vertoonde, ook de koolzuurontwikkeling waarneembaar werd. Dit gold zoowel voor de proeven met Marmite, als voor die met een mengsel van aneurine en β-alanine. Terwijl tevens aan de testen met Marmite kon worden geconstateerd, dat de gisting een constante waarde kreeg zoodra de celvermeerdering tot stilstand was gekomen.

Aan de hand van de verkregen resultaten was het duidelijk, dat een werking van een Z-preparaat pas met succes zou kunnen worden waargenomen bij een zich niet meer vermeerderend aantal cellen met een constante gisting.

Bij den aanvang van de test is immers het groei- en gistingsproces zoo nauw met elkaar verbonden, dat een geactiveerde gisting zeer moeilijk, zoo niet onmogelijk zal kunnen worden opgemerkt, vooral als een, nog met groeifactoren verontreinigd, Z-preparaat ook snellere groei doet ontstaan. Om deze moeilijkheden te vermijden werd de volgende testmethode ontworpen, die neerkomt op een combinatie van de Ide- en de reeds vroeger toegepaste von Euler-testmethodiek.

In een serie kolfjes met 30 cm^3 voedingsoplossing en één cm^3 gedestilleerd water, waarin 8 mg Marmite **) was opgelost, werd bij 26° in de broedstoof een hoeveelheid gist gekweekt, die na ongeveer 100 uur een constante koolzuurontwikkeling van circa 2 mg CO_2 per uur leverde. Deze hoeveelheid Marmite werd gekozen, omdat dan na vier à vijf dagen een behoorlijke hoeveelheid gist was gevormd; nephelometrische bepalingen toonden, dat er per kolfje op dat tijdstip ongeveer 50 mg gist aanwezig was.

Van een kweeken met minder Marmite werd afgezien om den groeitijd te bekorten, hetgeen ook de reden was waarom niet als groeistoffen aneurine en β-alanine werden verkozen. Buitendien

---

*) Voor den ijver en de nauwgezetheid, waarmede Mej. M. Visser de nephelometrische- en verschillende gistingsbepalingen voor mij uitvoerde, betuig ik haar hier mijn oprechten dank.

**) Later werd die hoeveelheid op 9 mg Marmite gebracht.

hadden vroegere proeven nog getoond, dat een gist, die werd gekweekt op aneurine en β-alanine, zoodanig veranderde, dat toevoeging van een weinig Marmite geen invloed meer uitoefende op het groei- en gistingsverloop.

Door dagelijks het gewicht van de kolfjes te bepalen, kon uit het verloop van de koolzuurontwikkeling ook het groeiproces worden gevolgd. Voor het verdere gedeelte van de test, dat direct na de laatste gewichtsbepaling plaats vond, werden alleen die kolfjes gebruikt, waarvan de waarde der koolzuurafgifte overeenkwam met het gemiddelde gewichtsverlies van de geheele serie.

Nadat bij een dergelijk kolfje 1 cm^3 oplossing (of gedestilleerd water voor een „blanco" *)-proef) was gevoegd, werd het aangesloten aan een open-manometer volgens W a r b u r g in een schudthermostaat bij 26°, die tot op 0,1° nauwkeurig was geregeld. De manometers waren gevuld met Brodiesche vloeistof, een oplossing van 23 gram keukenzout en 5 gram choleïnezuurnatrium in 500 cm^3 water, die met een weinig eosine was gekleurd. Het gebruik van een dergelijke oplossing vergemakkelijkte het aflezen van den stand der manometers buitengewoon, daar de glaswand beter wordt bevochtigd.

De gisting verliep nu bij een druk vrijwel gelijk aan dien van de buitenlucht, waarbij het kweekproces ook had plaats gevonden. Wel bestaat de mogelijkheid van koolzuurabsorptie in de manometervloeistof, maar, daar wij de gistingsactiveering steeds berekenen ten opzichte van een tegelijkertijd uitgevoerde blanco-proef, waarbij eveneens absorptie plaats zal vinden, meenen wij den invloed van dit verschijnsel, zeker bij een biologische test, te kunnen verwaarloozen.

Het aantal schommelingen per minuut bedroeg honderd. Alvorens de eigenlijke meting, die twee uur duurde, een aanvang nam, moesten de kolfjes met inhoud een uur worden geschud, waarna de gisting een regelmatig verloop had gekregen. Tijdens het aflezen van den stand der manometers, dat elk uur geschiedde, moest de schudinrichting worden gestopt.

De waarden van de resultaten, vermeld in tabel I, alhoewel geens-

---

*) Deze uitdrukking zullen wij kortheidshalve altijd bezigen bij proeven, waar uitsluitend gedestilleerd water aan de voedingsoplossing wordt toegevoegd.

zins van gelijke grootte, toonden toch wel, dat de gevoeligheid van het zelfgekweekte ras 1100 zeer gering was.

Tabel I
Het factor Z-effect bij gistras 1100, dat op Marmite was gekweekt

Gist gekweekt op	cm^3 ontwikkeld CO_2 per uur bij toevoeging van			Gistingsactiveering**) bij toevoeging van	
	Blanco	10 mg M*)	25 mg M	10 mg M	25 mg M
8 mg Marmite	0,22	0,26	0,30	18 %	36 %
8 „ „	0,40	0,50	0,50	25 „	25 „
9 „ „	0,57	0,61	0,70	7 „	23 „
9 „ „	1,00	1,25	1,27	25 „	27 „
9 „ „	0,30	0,32	0,34	7 „	13 „
9 „ „	1,00	1,06	1,11	6 „	11 „
9 „ „	0,89	0,97	1,11	9 „	25 „

Tabel II
Het factor Z-effect bij, op Marmite gekweekt gistras M en ras No. 1169, in vergelijking met dat bij het technische ras M

Gist	Gistingsactiveering bij toevoeging van	
	10 mg M	25 mg M
Ras M (25 mg techn. product)	42 %	61 %
„ „ gekw. op 9 mg Marmite	10 „	25 „
„ „ „ „ 9 „ „	15 „	28 „
„ „ „ „ 9 „ „	12 „	30 „
Ras 1169 „ „ 9 „ „	8 „	16 „
„ 1169 „ „ 9 „ „	13 „	26 „
„ 1169 „ „ 9 „ „	7 „	24 „

Op gelijke wijze werden een andere Wildiers-gist: ras No. 1169 en ras M gekweekt, maar het resultaat was ongeveer gelijk aan dat van ras 1100. De gevoeligheid voor factor Z is bij een fabrieksproduct veel grooter, want 25 mg gist van het tech-

*) Kortheidshalve zullen wij dikwijls ook in het vervolg Marmite aangeven met M.

**) Bepaald volgens de formule van pag. 30.

nische ras M in 31 cm^3 voedingsoplossing gaf onder volkomen gelijke condities van de manometertest met 10 mg Marmite een activeering van 42 % en met 25 mg Marmite zelfs 61 %.

Nu was het wel duidelijk, dat een gist, gekweekt volgens de methode van Ide, eigenschappen had, welke volkomen afweken van die van een technisch product. Niet alleen dat de verkregen waarden groote schommelingen vertoonden, maar ook de Z-eenheid (50 % gistingsvermeerdering) werd nimmer bereikt.

Daar deze test bovendien voor een standaardmethode te veel tijd bleek te vereischen, werd het tot nu gevolgde principe geheel verlaten.

Daarom werd opnieuw de reeds bekende werkwijze van von Euler[44]) met een in den handel verkrijgbare gist aan een nauwkeurig onderzoek onderworpen.

a. De voedingsoplossing

De voedingsoplossing werd, in afwijking van de vroeger gebruikelijke, samengesteld op de door Reader[75]) aangegeven wijze. Alleen het glucose-gehalte werd verhoogd, opdat tijdens de test nimmer een gebrek aan suiker zou kunnen ontstaan. Zoodoende werd de samenstelling: *)

gedestilleerd water tot	1000	cm^3
glucose	100	gram
$(NH_4)_2SO_4$	3	„
$MgSO_4.7H_2O$	0,7	„
KH_2PO_4	1	„
K_2HPO_4	0,16	„
NaCl	0,5	„
$Ca(NO_3)_2$	0,4	„

Een groote hoeveelheid van deze oplossing werd twee maal gedurende 30 minuten gesteriliseerd en in een ijskast bewaard.

---

[75]) V. Reader, Biochem. J. 21, 904 (1927).

*) De gebruikte chemicaliën waren van de kwaliteit „pro analysi".

b. De uitvoering van de von Euler-test [44])

Een willekeurig afgewogen hoeveelheid gist werd gesuspendeerd in zoo veel voedingsoplossing, van de hiervoor aangegeven samenstelling, dat per cm^3 oplossing 50 mg gist aanwezig was. Deze suspensie werd in een fleschje bij kamertemperatuur gedurende 15 minuten krachtig geschud, waarna het afgesloten fleschje nog ongeveer 40 minuten bij dezelfde temperatuur bleef staan. In dien tusschentijd werden de proefkolfjes, die een inhoud hebben van 50 cm^3, voorzien van één cm^3 oplossing, die op haar Z-activiteit moest worden onderzocht.

Vervolgens werd nauwkeurig 1 cm^3 van de telkens opnieuw geschudde gistsuspensie in elk kolfje gepipetteerd op een dusdanig tijdstip, dat de kolfjes precies na 60 minuten, gerekend van het tijdstip waarop de gist aan de voedingsoplossing werd toegevoegd, in den schudthermostaat konden worden geplaatst.

Deze schudthermostaat was ingericht voor 12 proefkolfjes. De temperatuur werd op 30° (± 0,1°) gehouden, terwijl geschud werd met een tempo van ongeveer honderd schommelingen per minuut. De koolzuurontwikkeling werd weer manometrisch bepaald, terwijl als manometervloeistof de reeds eerder beschreven Brodiesche oplossing diende.

De beginstand van de manometers werd 15 minuten na het plaatsen van de kolfjes in den schudthermostaat afgelezen. De verdere bepalingen hadden telkens om de 15 minuten plaats, waardoor ook het tusschentijdsche verloop der gisting kon worden waargenomen. Nadat de kolfjes 60 minuten waren geschud, was de koolzuurproductie bekend tijdens de laatste 45 minuten. Deze waarde werd met 4/3 vermenigvuldigd, waardoor de koolzuurontwikkeling werd verkregen, die plaats had in het „eerste uur". Van deze formuleering werd nooit afgeweken. De waarde voor het „tweede uur" was direct als verschil van twee manometerstanden te bepalen.

Bij elke serie van twaalf kolfjes waren er steeds twee, een aan het begin en een aan het eind van de reeks, waarbij één cm^3 gedestilleerd water aan de gistsuspensie was toegevoegd, ter bepaling van de blanco-gisting.

De formule $\frac{100 \times (\text{cm}^3 \text{ geactiveerde gisting} - \text{cm}^3 \text{ blanco-gisting})}{\text{cm}^3 \text{ blanco-gisting}}$

geeft de activeeringswaarde in procenten.

c. De gist

Elk gistmonster werd na ontvangst op het laboratorium fijn verdeeld en in een koelkast bewaard. Een dergelijke zending diende hoogstens acht achtereenvolgende dagen voor de test en werd daarna vervangen door een nieuwe hoeveelheid. Daar de gewone testduur in den regel slechts drie uren bedroeg, was de kans, dat vreemde micro-organismen tot ontwikkeling zouden komen, zeer gering.

De gewone bakkersgisten, Hollandia- en Koningsgist, alsook de biergisten van Heineken en De Drie Hoefijzers werden in vergelijking met elkaar onderzocht. Tegelijkertijd vonden ook bepalingen plaats van het toenmalige gedrag van ras M. De resultaten waren:

Tabel III

De gistingsactiveering bij toevoeging van Marmite bij Hollandiagist, Koningsgist en gistras M

Met een toevoeging van	Hollandiagist		Koningsgist		Ras M	
	Activeering i/h		Activeering i/h		Activeering i/h	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
5 mg Marmite	15 %	30 %	41 %	51 %	57 %	66 %
10 „ „	19 „	60 „	61 „	108 „	71 „	120 „
15 „ „	18 „	71 „	59 „	146 „	72 „	150 „
20 „ „	17 „	79 „	64 „	166 „	74 „	170 „
25 „ „	19 „	90 „	62 „	176 „	77 „	180 „

De biergisten bleken totaal ongeschikt voor een test op factor Z, want zelfs in het tweede uur kon met 20 à 25 mg Marmite slechts een activeering van ongeveer 28 % worden verkregen.

De resultaten met Koningsgist en ras M waren veel beter. Hollandiagist vertoonde een vrij hooge spontane gisting, die door Marmite slechts in geringe mate kon worden verhoogd.

Overigens blijkt ook nog uit de waarden van tabel III, dat alleen in het eerste uur kan worden gesproken van een maximale gisting, zooals von Euler[32]) dit begrip had ontwikkeld, waarop wij in het derde hoofdstuk nog terugkomen.

Hollandiagist verkrijgt reeds door een toevoeging van 5 mg Marmite zijn maximale gistingsvermogen, hetgeen doet vermoeden, dat het den gistcellen bij hun kweekproces aan niet veel mankeert, tenzij de cellen van deze gistsoort zelf in staat zijn de noodige stoffen te synthetiseeren. Daarom werd van het gebruik van Hollandia-gist voor de test afgezien.

De uitkomsten, verkregen met Koningsgist in vergelijking met ras M, waren zoodanig, dat een keuze voor het verdere werk moeilijk was te nemen. Aanvankelijk werden dan ook de meeste proeven met beide gistsoorten verricht; later moest door bijzondere omstandigheden dikwijls alleen Koningsgist worden gebruikt.

Tot dusverre waren in het Utrechtsche laboratorium de Z-testen zoo uitgevoerd, dat de verhoogde koolzuurontwikkeling in het, door mij genoemde, tweede uur werd bepaald. Niet alleen de ervaring, dat juist dan de waarde van de activiteit eenige tientallen procenten kan verschillen, maar ook de toen nog onbekende oorzaak van die geweldige activeering, deed ons besluiten, de gisting in het éérste uur voor de Z-test te gebruiken.

De veronderstelling, dat er reeds in het tweede uur bij aanwezigheid van Marmite celvermeerdering optrad, kon later zoowel nephelometrisch bij ras M, als met telproeven bij Koningsgist worden bewezen.

De nephelometrische test werd als volgt uitgevoerd:

Een serie van 14 kolfjes werd op de gebruikelijke wijze voorzien van elk 25 mg gist en een onderling gelijke hoeveelheid Marmite. Zoo ook een blanco serie. Aan het begin van het eerste uur werden twaalf kolfjes in den schudthermostaat geplaatst, terwijl de gist in de overblijvende kolfjes werd gedood met 45 cm^3 chloorkresoloplossing. De totale inhoud van de verkregen 47 cm^3 was voldoende voor een nephelometrische bepaling in duplo; van het tweede kolfje werd een andere waarde verkregen, die met de eerste goed overeenstemde. Van de overige kolfjes werd de gisting op de normale wijze bepaald, terwijl tijdens het aflezen van de manometerstanden telkens twee kolfjes werden verwijderd om nephelometrisch te worden gemeten.

Het eenige verschil met de gewone test bestond hierin, dat er in plaats van

50 mg gist per kolfje, 25 mg aanwezig was, omdat de verkregen extinctiewaarde voor 50 mg erg hoog was, namelijk ± 85 Ω.

De uitkomsten van een paar nephelometrische bepalingen zijn in tabel IV ondergebracht.

Tabel IV

De gistings- en nephelometrische groeibepaling van gistras M

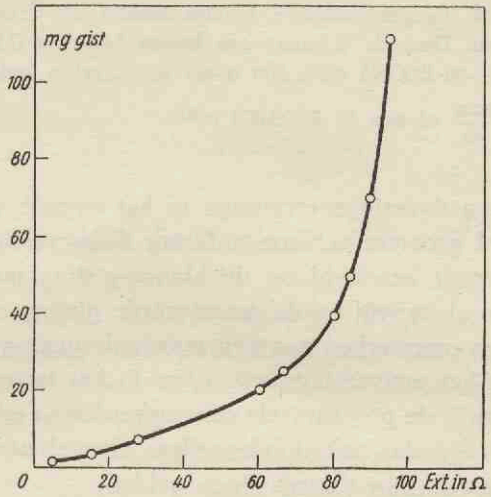
Tijd in minuten	Zonder toevoeging			Met toevoeging van					
				5 mg Marmite			25 mg Marmite		
	cm^3 CO_2-ontw.	Ext. in Ω	Groei in %	cm^3 CO_2-ontw.	Ext. in Ω	Groei in %	cm^3 CO_2-ontw.	Ext. in Ω	Groei in %
Beginwaarde		66,3	0		66,3	0		66,2	0
0 tot 15		67,8	3						
15 „ 30	0,37	70,0	10	0,50	70,0	10	0,56	69,9	10
30 „ 45	0,34	71,2	16	0,52			0,62		
45 „ 60	0,34	72,3	20	0,63	73,2	24	0,62	73,7	28
60 „ 75	0,43	72,7	24	0,63	75,0	33	0,75	74,7	32
75 „ 90	0,33	75,1	33	0,76	76,9	44	0,78	76,7	43
90 „ 105	0,32	74,5	30	0,78	78,2	52	1,03	79,4	60
105 „ 120	0,39	75,1	33	0,76	79,1	56	1,21	80,7	68
Gistingsactiveering									
in het eerste uur. . .		0 %			57 %			71 %	
in het tweede uur . .		0 „			99 „			156 „	

De extinctiewaarden geven niet direct den procentueelen groei aan. Deze werd bepaald aan de hand van figuur 3, waarin de kromme is samengesteld door de extincties van verschillende suspensies uit te zetten tegen de ingewogen hoeveelheden gist.

De resultaten, zooals die in tabel IV zijn vermeld, duiden wel aan, dat er vooral bij aanwezigheid van Marmite celvermeerdering heeft plaats gevonden. Maar men mag niet over het hoofd zien, dat een hoogere nephelometerwaarde twee oorzaken kan hebben, namelijk:

1. celvergrooting, hetgeen den groei verklaart, wanneer er geen Marmite wordt toegevoegd. Het verschijnsel werd overigens ook onder den microscoop geconstateerd;

2. celvermeerdering, die het surplus van de Marmite werking boven den blanco-groei moet verklaren.



Figuur 3

Het verband tusschen het aantal mg gist in 47 cm³ vloeistof en de troebelingswaarde in Ω

Dat wij inderdaad in het tweede uur reeds rekening moesten houden met celvermeerdering, werd nog bevestigd door telproeven, die van Koningsgist met een Bürker-Zeiss telkamer werden uitgevoerd. Het resultaat daarvan is in tabel V opgenomen.

Tabel V

Telproeven van 50 mg Koningsgist met de Bürker-Zeiss telkamer. (Het aantal cellen moet telkens met 2,5 millioen worden vermenigvuldigd.)

Tijdstip	Zonder toevoeging		Met toevoeging van			
			5 mg Marmite		10 mg Marmite	
	Aantal	Groei in %	Aantal	Groei in %	Aantal	Groei in %
Beginwaarde . . .	270	0	268	0	272	0
Na het eerste uur	275	0	280	4	313	16
Na het tweede uur	268	0	289	7	322	19

De gist in de 2 cm^3 testoplossing werd gedood met 23 cm^3 chloorkresol-oplossing. Van de aldus verkregen suspensie werd met behulp van een pipet een druppel in de telkamer gebracht. Vervolgens had de telling plaats van de gistcellen in 40 hokjes van $^1/_{400}$ mm^2, waarbij ook de dochtercellen, zoodra deze de grootte van $\pm$ $^1/_3$ der moedercel hadden bereikt, als afzonderlijke cellen werden beschouwd. Daar de telkamer een hoogte had van 0,1 mm, had elk vakje een inhoud van 0,00025 mm^3. Het totaal aantal cellen bedroeg zoodoende

$$\frac{25000\ mm^3}{0{,}00025\ mm^3} \times \frac{som}{40} \text{ of som} \times 2.500.000 \text{ cellen.}$$

Het enorme activeeringspercentage in het tweede uur zou misschien een veel grootere celvermeerdering doen verwachten, maar de activiteit wordt berekend op de blanco-gisting met een gelijk gebleven cellental, terwijl bij de geactiveerde gisting ook de nieuw gevormde cellen meewerken aan een maximale gisting.

Daardoor is het activeeringspercentage in het tweede uur zeker geflatteerd, terwijl de procentueele celvermeerdering eerder aan den lagen kant is, doordat ook doode cellen, zoowel nephelometrisch als in de telkamer, hun waarde doen gelden.

Thans kon met zekerheid worden geconcludeerd, dat het gistingsverloop vooral in het eerste uur voor de Z-werking kenmerkend is.

Op dit tijdstip moesten de proefnemingen wegens buitengewone omstandigheden gedurende 15 maanden worden gestaakt.

HOOFDSTUK III

DE INVLOED VAN BIOS-FACTOREN OP DE GISTING

Bij de voortzetting van het onderzoek werd rekening gehouden met de mogelijkheid, dat factor Z identiek kan zijn met één van de thans bekende bios-factoren of dat deze factor een combinatie is van enkele dier verbindingen.

Voor een dergelijk onderzoek kwamen in aanmerking aneurine (vitamine B_1), adermine (vitamine B_6), pantotheenzuur, biotine en meso-inosiet, terwijl verder nog de werking van lactoflavine (vitamine B_2), ascorbinezuur (vitamine C), cozymase, β-alanine en nicotinezuuramide afzonderlijk en in combinatie met de genoemde bios-factoren kon worden nagegaan.

Om een aansluiting met de reeds besproken resultaten te verkrijgen, was het noodzakelijk de werking van Marmite op Koningsgist en ras M opnieuw te onderzoeken.

Tabel VI

De gistingsactiveering bij toevoeging van Marmite aan Koningsgist en gistras M

Met een toevoeging van	Koningsgist		Ras M	
	Activeering in het		Activeering in het	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
5 mg Marmite	62 %	69 %	49 %	55 %
10 „ „	110 „	148 „	69 „	101 „
20 „ „	125 „	266 „	68 „	138 „
40 „ „	120 „	320 „	73 „	148 „

In vergelijking met tabel III vertoont ras M vrijwel hetzelfde gedrag als vroeger. Koningsgist heeft echter een lagere blanco-gisting met een grootere gevoeligheid voor Marmite gekregen.

Deze laatste ondervinding, met het verschijnsel dat de activeeringswaarde van later ontvangen gistmonsters van ras M aan groote schommelingen onderhevig was, waaraan de transportduur van 7 tot 10 dagen, onder de gewijzigde omstandigheden, zeker niet vreemd zal zijn geweest, deed ons besluiten het onderzoek in hoofdzaak met Koningsgist (van de Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek te Delft) uit te voeren.

Toch bleek ook de werking van Koningsgist in een tijdsverloop van ongeveer negen maanden niet constant. Dit was onder andere merkbaar aan een langzaam verminderende blanco-gisting, die het volgende verloop had:

Tabel VII

De spontane gisting van Koningsgist

50 mg Koningsgist	Blanco-gisting 1e uur	Blanco-gisting 2e uur
Maart 1939	3,99 cm³ CO_2	3,73 cm³ CO_2
Juli 1940	3,31 „ „	2,71 „ „
Sept. 1940	3,26 „ „	2,65 „ „
Nov. 1940	3,01 „ „	2,54 „ „
Jan. 1941	2,89 „ „	2,55 „ „
Maart 1941	2,38 „ „	2,38 „ „

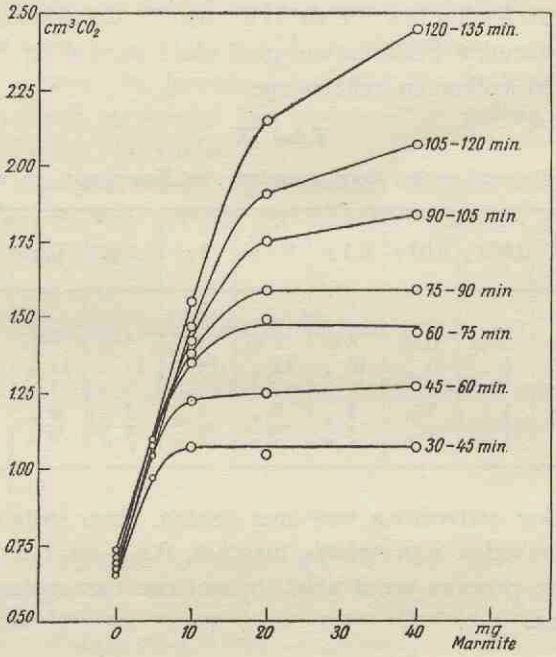
Reeds eerder werd opgemerkt, dat alleen in het eerste uur van een maximale gisting kan worden gesproken. Dit bleek nóg het geval te zijn, terwijl tevens werd waargenomen, dat de minimale hoeveelheid Marmite noodig voor een totaal geactiveerde gisting met den tijd verschoof naar grootere Marmite-concentraties. Dit laatste is waar te nemen aan het volgende voorbeeld, dat ook in teekening is gebracht:

Tabel VIII

De werking van Marmite bij ras M

Toegevoegd Marmite	cm³ CO_2 per 15 min.		1e uur		cm³ CO_2 per 15 minuten				2e uur		cm³ CO_2
	*) 30/45	45/60	cm³ CO_2	Act.	60/75	75/90	90/105	105/120	cm³ CO_2	Act.	120/135
Blanco	0,66	0,70	2,72	**0** %	0,74	0,68	0,68	0,70	2,80	**0** %	0,72
5 mg	0,98	1,05	4,06	**49** „	1,10	1,11	1,08	1,05	4,34	**55** „	1,10
10 „	1,07	1,23	4,60	**69** „	1,36	1,38	1,43	1,47	5,64	**101** „	1,55
20 „	1,05	1,24	4,58	**68** „	1,49	1,59	1,76	1,93	6,77	**138** „	2,19
40 „	1,08	1,27	4,70	**73** „	1,44	1,58	1,84	2.09	6,95	**148** „	2,44

*) Door omstandigheden werd de CO_2-ontwikkeling van 15 tot 30 minuten niet bepaald.



Figuur 4

De werking van Marmite bij ras M

De waargenomen verschijnselen bevestigden onze veronderstelling, dat de maximaal geactiveerde gisting door minstens twee factoren wordt beïnvloed. In de eerste plaats zal de permeabiliteit van den celwand de opneming in de cel regelen van de versnellende factoren, terwijl verder een toenemend aantal cellen ook een grootere hoeveelheid actieve stoffen noodig zal hebben. Beide factoren kunnen geheel of gedeeltelijk dit verloop van de maximale activeering verklaren.

Vervolgens werden de, in het begin van dit hoofdstuk genoemde verbindingen aan het gistingsmilieu toegevoegd met resultaten, die achtereenvolgens zullen worden beschreven.

a. De toevoeging van aneurine (vitamine B_1)

De hoeveelheden, die aan de twee cm^3 testoplossing werden toegevoegd, variëerden tusschen 0,002 γ en 2 mg. Een quantitatief effect, zooals Schultz[60]) en Heyns[61]) dit opmerkten bij de door hen gebruikte Fleischmann-gist, bleef zoowel bij Koningsgist als bij ras M volkomen achterwege.

Tabel IX

De gistingsactiveering door aneurine van Koningsgist en ras M

Toegevoegd aneurine	0,002 γ	0,03 γ	0,1 γ	0,5 γ	2 γ	8 γ	32 γ	500 γ	2 mg
Ras M									
act. 1e uur	3 %	0 %	8 %	7 %	8 %	5 %	5 %	5 %	5 %
„ 2e „	0 „	0 „	10 „	12 „	14 „	11 „	11 „	10 „	10 „
Koningsgist									
act. 1e uur	1 „	5 „	5 „	7 „	4 „	5 „	6 „	6 „	10 „
„ 2e „	1 „	2 „	5 „	10 „	9 „	9 „	9 „	12 „	12 „

De bereikte activeering was zeer gering, maar vrijwel constant voor hoeveelheden variëerende tusschen 0,5 γ en 2 mg. Vandaar dat bij latere proeven werd volstaan met een toevoeging van 1 tot 8 γ aneurine.

b. De toevoeging van adermine (vitamine B_6)

Adermine, als chloorhydraat, had in hoeveelheden tusschen 2 en

500 γ geen enkele werking op ras M; Koningsgist vertoonde wel eenige activiteit: in het tweede uur werd met dezelfde hoeveelheden een gistingsversnelling bereikt van ongeveer 10 %, meer dan 500 γ adermine deed die activeering weer verminderen.

c. De toevoeging van meso-inosiet

De aanwezigheid van meso-inosiet (200 tot 800 γ) in het gistingsmilieu kon in het geheel geen verandering in de koolzuurontwikkeling teweeg brengen, zoodat wij de werking van meso-inosiet, die von Euler[36]) bij de door hem gebruikte gist opmerkte, niet konden bevestigen.

d. De toevoeging van biotine *)

Indien zuiver biotine, als methylester, werd toegevoegd, verminderde de gisting van ras M met een waarde van enkele procenten, terwijl bij Koningsgist in dezelfde concentraties — 10 tot 50 γ per 2 cm^3 — een zeer geringe activeering van de koolzuurontwikkeling viel waar te nemen. Dit eigenaardige gedrag van biotine zal later worden behandeld.

In het algemeen komt dit resultaat overeen met dat van van Hulssen[31]), hetwelk met een niet-gekristalliseerd preparaat was verkregen.

e. De toevoeging van dl-pantotheenzuur **)

Als Na-zout werd deze stof bij de gistende oplossing gevoegd. Ook hier werd de werking nagegaan op Koningsgist en ras M.

---

*) Het biotine werd mij welwillend door den Heer J. H. Verbeek ter beschikking gesteld, waarvoor ik hem hierbij mijn welgemeenden dank betuig.

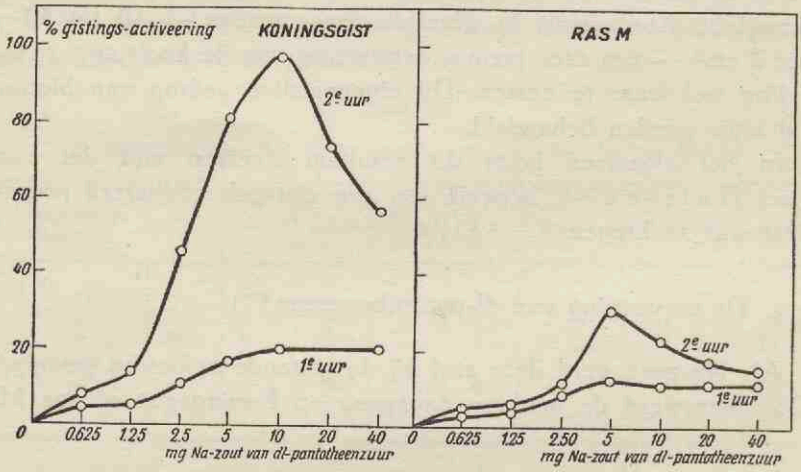
**) Dit preparaat werd, evenals het aneurine, adermine en het later te behandelen αγ-dioxy-ββ-dimethylboterzuurlacton, 2-methyl-5-methylamine-6-aminopyrimidine en 4-methyl-5 β-oxyaethylthiazool, ontvangen van de I. G. Farbenindustrie, Werk Elberfeld, waarvoor ik mijn bijzonderen dank betuig.

Tabel X

De gistingsactiveering door pantotheenzuur van Koningsgist en ras M

Toevoeging	Gistingsactiveering			
	Koningsgist		Ras M	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
40 mg dl-pantotheenzuur-natrium	20 %	57 %	12 %	16 %
20 „ „	—	74 „	12 „	18 „
10 „ „	20 „	97 „	11 „	23 „
5 „ „	17 „	81 „	13 „	31 „
2,5 „ „	11 „	46 „	9 „	12 „
1,25 „ „	5 „	14 „	4 „	6 „
0,625 „ „	4 „	8 „	3 „	4 „

Hoeveelheden van 2,5 γ tot 625 γ hadden bij beide gistsoorten totaal geen werking.



Figuur 5

De werking van pantotheenzuur bij Koningsgist en ras M

Zooals uit de figuur, die bovenstaande tabel in beeld brengt, duidelijk is te zien, vertoont de gistingswaarde van beide gistsoorten een maximum bij de toevoeging van 5 à 10 mg pantotheen-

zuur, alleen met dit verschil, dat Koningsgist in het algemeen veel sterker reageert op de aanwezigheid van dezen factor.

De benoodigde hoeveelheden om een dergelijk effect te bereiken waren echter groot; in het verdere gedeelte zal blijken, dat een co-factor een belangrijke pantotheenzuurbesparing kan geven.

Williams heeft ook een gistingstimuleerende werking van pantotheenzuur waargenomen [57]), waarvan hij echter niet een als door ons verkregen maximum vermeldt.

f. De toevoeging van lactoflavine (vit. B_2), ascorbinezuur (vit. C), cozymase, β-alanine en nicotinezuuramide *)

Geen tot 7 % activeering geeft lactoflavine aan de beide gistsoorten in een concentratie van 0,02—50 γ. Daar bij de biologische testmethode rekening moet worden gehouden met een fout van ongeveer 5 %, kan de werking van lactoflavine worden verwaarloosd.

Ascorbinezuur had in het geheel geen invloed op het gistingsverloop (Koningsgist).

Dit was eveneens het geval als een cozymase-preparaat (per gram 290.000 co) in hoeveelheden, variëerend tusschen 20 γ en 500 γ werd toegevoegd, hetgeen in overeenstemming was met het resultaat, dat von Euler [32]) [33]) vroeger had verkregen.

Zooals te verwachten was, had nicotinezuuramide, dat door een hydrolytische splitsing van cozymase is te verkrijgen, geen belangrijke invloed op het verloop van de koolzuurontwikkeling. Hoeveelheden kleiner dan ongeveer 500 γ werkten zelfs remmend op de gisting, 1 mg veroorzaakte slechts gemiddeld 5 % activeering, terwijl 4 mg het niet verder bracht dan 20 %.

Schultz heeft ook een dergelijk resultaat met nicotinezuuramide verkregen [76]).

Het effect, dat β-alanine veroorzaakte, was minder dan werd verwacht. Door Williams werd aangetoond, dat β-alanine een

---

*) Deze stoffen werden in hun werking hoofdzakelijk op ras M getest.

[76]) A. S. Schultz, L. Atkin en C. N. Frey, J. Am. Chem. Soc. **60**, 1514 (1938).

belangrijk deel uitmaakt van pantotheenzuur [77]), terwijl het ook gedeeltelijk de groeiwerking van dezen factor kan bewerkstelligen [78]). De bereikte percentages voor hoeveelheden tusschen 200 γ en 1,6 mg bleven beneden de 5 % en moesten dus worden verwaarloosd.

g. Gelijktijdige toevoeging van bovengenoemde verbindingen

Daar ook met de mogelijkheid rekening werd gehouden, dat de factor Z-werking zou kunnen worden verkregen door een combinatie van groeifactoren met of zonder andere verbindingen, werden verschillende mengsels op hun Z-activiteit getest.

Het aantal mogelijkheden is legio, vooral omdat ook de gewichtsverhoudingen kunnen worden gevariëerd.

Het hier volgende overzicht kan dan ook geenszins aanspraak maken op volledigheid. Wel meenen wij de belangrijkste combinaties te hebben onderzocht.

Pantotheenzuur had getoond een Z-actieve verbinding te zijn. Al spoedig bleek dat aneurine een belangrijk „pantotheenzuurbesparende" werking had, zoowel bij het gebruik van Koningsgist als van ras M.

Tabel XI

De gistingsactiveering door pantotheenzuur (P.z.) *) met en zonder toevoeging van aneurine

Toevoeging	Koningsgist				Ras M			
	zonder B_1		met 8 γ B_1		zonder B_1		met 8 γ B_1	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
Blanco	0 %	0 %	5 %	9 %	0 %	0 %	5 %	11 %
0,50 mg P.z. . . .	—	—	9 „	11 „	—	—	12 „	15 „
0,625 „ „ . . .	4 „	8 „	—	—	3 „	4 „	—	—
0,750 „ „ . . .	—	—	12 „	21 „	—	—	—	—
1,00 „ „ . . .	—	—	20 „	28 „	—	—	26 „	28 „
1,25 „ „ . . .	5 „	14 „	—	—	4 „	6 „	—	—
2,50 „ „ . . .	11 „	46 „	35 „	64 „	9 „	12 „	31 „	52 „
5,00 „ „ . . .	17 „	81 „	37 „	117 „	13 „	31 „	22 „	55 „

[77]) H. H. Weinstock, H. K. Mitchel, E. E. Pratt en R. J. Williams, J. Am. Chem. Soc. **61**, 1421 (1939).

[78]) R. J. Williams en E. Rohrman, J. Am. Chem. Soc. **58**, 695 (1936).

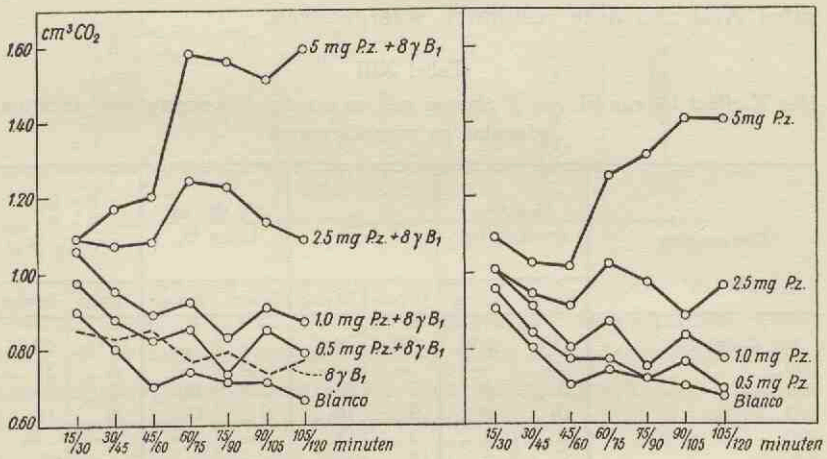
*) Kortheidshalve geven wij ook in het vervolg het Na-zout van dl-pantotheenzuur aan met P.z.

Als voorbeeld van een dergelijke pantotheenzuur-besparende werking van aneurine wordt het resultaat van een test met Koningsgist in onderstaande tabel XII met bijbehoorende figuur 6 volledig weergegeven.

Tabel XII

De gistingsactiveering door pantotheenzuur met en zonder aneurine

Koningsgist Sept. '40	CO_2-ontw. in cm^3 per 15 min.			cm^3 CO_2 1e u.	act. in %	CO_2-ontw. in cm^3 per 15 min.				cm^3 CO_2 2e u.	act. in %
	15 tot 30	30 tot 45	45 tot 60			60 tot 75	75 tot 90	90 tot 105	105 tot 120		
Blanco	0,90	0,80	0,68	3,17	**0**	0,74	0,71	0,71	0,66	2,82	**0**
0,5 mg P.z. + 8 γ B_1	0,98	0,88	0,82	3,57	**12**	0,85	0,73	0,85	0,79	3,22	**13**
1 „ „ + 8 „ „	1,06	0,95	0,89	3,87	**21**	0,92	0,83	0,91	0,87	3,53	**24**
2,5 „ „ + 8 „ „	1,09	1,07	1,08	4,32	**35**	1,24	1,22	1,13	1,08	4,67	**64**
5 „ „ + 8 „ „	1,06	1,17	1,20	4,57	**43**	1,58	1,56	1,51	1,59	6,24	**120**
0,5 „ „ . . .	0,95	0,84	0,77	3,41	**6**	0,77	0,72	0,76	0,69	2,94	**3**
1,0 „ „ . . .	1,00	0,91	0,80	3,61	**13**	0,87	0,75	0,83	0,77	3,22	**13**
2,5 „ „ . . .	1,01	0,94	0,91	3,81	**19**	1,02	0,97	0,88	0,96	3,83	**35**
5 „ „ . . .	1,09	1,02	1,01	4,16	**30**	1,25	1,31	1,40	1,40	5,36	**89**
8 γ B_1	0,85	0,81	0,85	3,35	**5**	0,77	0,79	0,73	0,78	3,07	**8**
Blanco	0,90	0,80	0,72	3,23	**0**	0,74	0,72	0,70	0,70	2,86	**0**



Figuur 6

De gistingsactiveering door pantotheenzuur met en zonder aneurine

Daar in dit voorbeeld de resultaten zijn vermeld van één uitgevoerde test, wijken de percentages eenigszins af van die van tabel XI, welke de gemiddelde cijfers geeft van alle uitgevoerde testen met dezelfde toevoeging. Dit laatste geldt voor alle tabellen van dit proefschrift, die uitsluitend het Z-effect in procenten vermelden.

Tevens werden beproefd mengsels van pantotheenzuur met β-alanine, nicotinezuuramide en cozymase, doch zonder effect.

Ook grootere (tot ruim 2 mg) en kleinere hoeveelheden aneurine zijn nog toegevoegd aan pantotheenzuur, maar voor beide gistsoorten bleek, dat de co-werking achterwege bleef bij de aanwezigheid van minder dan 1 γ aneurine, terwijl grootere aneurineconcentraties de co-werking niet verhoogden.

Bij het verdere onderzoek werd het mengsel van *1 mg pantotheenzuur met 8 γ aneurine* in vele gevallen als een standaardmengsel gekozen.

Een verdere menging met adermine, β-alanine, lactoflavine, cozymase, nicotinezuuramide en biotine leverde geen resultaat.

Het β-alanine, dat geen noemenswaardig Z-effect veroorzaakte, bleek evenals het pantotheenzuur bij gebruik van aneurine als coverbinding, een niet te verwaarloozen werking uit te oefenen. Een verdere toevoeging van adermine was ook hier zonder succes. In tabel XIII zijn deze resultaten weergegeven.

Tabel XIII

Het Z-effect bij ras M van β-alanine met en zonder toevoeging van aneurine, adermine en pantotheenzuur

Toevoeging	Zonder toevoeging		8 γ B_1		8 γ B_1 en 128 γ B_6		8 γ B_1, 128 γ B_6 en 0,5 mg P.z.	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
0 γ β-alanine . . .	0 %	0 %	5 %	9 %	—	—	15 %	19 %
100 „ „ . . .	—	—	—	—	—	—	6 „	21 „
200 „ „ . . .	0 „	0 „	6 „	15 „	0 %	12 %	6 „	19 „
400 „ „ . . .	0 „	0 „	9 „	16 „	0 „	17 „	6 „	15 „
800 „ „ . . .	0 „	3 „	9 „	18 „	—	—	—	—
1,6 mg „ . . .	0 „	5 „	14 „	31 „	—	—	—	—

Hieruit volgt dat de gistingsactiveering, die met behulp van

pantotheenzuur kan worden bereikt, voor een zeer belangrijk deel aan het β-alanine gedeelte van het pantotheenzuur moet worden toegeschreven, evenals dit het geval is bij de groeiwerking van dit zuur [78]). Deze overtuiging wordt nog versterkt door het feit dat β-alanine in kleine hoeveelheden geen invloed heeft op het Z-effect, dat door middel van pantotheenzuur wordt verkregen.

Dat het andere bestanddeel van pantotheenzuur geen invloed op de gisting uitoefent, werd nog proefondervindelijk bewezen door 500 γ van het αγ-dioxy-ββ-dimethylboterzuurlacton met aneurine toe te voegen, waarbij slechts de aneurineactiviteit werd bereikt (zie tabel XXI).

Van alle onderzochte combinaties moeten tenslotte nog die worden vermeld, waarin nicotinezuuramide als voornaamste bestanddeel aanwezig is.

Tabel XIV

De werking van nicotinezuuramide met en zonder aneurine bij gistras M

Nicotinezuuramide	Gistingsactiveering in procenten			
	Zonder aneurine		Met 8 γ aneurine	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
Zonder	0	0	6	15
0,031 mg . . .	negatief	negatief	7	16
0,062 „ . . .	„	„	8	14
0,125 „ . . .	„	„	9	17
0,500 „ . . .	0	3	9	21
1 „ . . .	3	4	12	29
2 „ . . .	3	2	19	37
4 „ . . .	19	16	21	50

Deze werking van nicotinezuuramide was des te meer verrassend, daar cozymase, waarvan het nicotinezuuramide deel uitmaakt, geen werking vertoonde. De activeering door de betrekkelijk groote hoeveelheden nicotinezuuramide zal waarschijnlijk berusten op diep ingrijpende veranderingen van de oxydo-reductie systemen, die in de cellen aanwezig zijn.

Ook in vergelijking met het reeds genoemde onderzoek van Schultz [76]), die eveneens het effect van nicotinezuuramide-

toevoeging bestudeerde op een al aanwezige aneurine-werking bij Fleischmann-gist, zijn de voor gistras M benoodigde hoeveelheden erg groot.

Maar ook een mengsel van alle bekende bios-factoren vertoonde geen verrassend groote werking ten opzichte van die, welke door het aneurine-pantotheenzuur mengsel werd verkregen, zoodat wij toen laatstgenoemd paar verbindingen wel als een voornaam bestanddeel van factor Z moesten opvatten.

Tabel XV

De werking van verschillende bios-factoren op Koningsgist. (0,1 cm^3 mengsel bevat: 0,025 mg meso-inosiet, 0,0005 mg aneurine, 0,00125 mg biotine-methylester, 0,25 mg dl-pantotheenzuur-natrium en 0,0005 mg adermine.)

Koningsgist	Gistingsactiveering in procenten	
	1e uur	2e uur
0,1 cm^3 bios-factoren	16	21
0,2 „ „	30	30
0,4 „ „	35	36
0,5 „ „	32	40
0,8 „ „	53	55
1 mg P.z. en 8 γ B_1 (Komt overeen met 0,4 cm^3 bios-factoren.)	20	28

Of het mengsel aneurine-pantotheenzuur geheel verantwoordelijk kan worden gesteld voor de verhoogde koolzuurontwikkeling, die met Marmite wordt verkregen, werd nagegaan door, behalve Marmite, ook genoemd mengsel aan het gistingsmilieu toe te voegen.

Zooals uit tabel XVI blijkt, moet de werking van het mengsel worden gezien als een verschijnsel, waarbij Marmite en de combinatie pantotheenzuur-aneurine vrijwel onafhankelijk van elkander op de gisting inwerken, of wij zouden een gehalte van 20 % l(+) pantotheenzuur in Marmite moeten veronderstellen, hetgeen zeer onwaarschijnlijk is, daar, volgens de ervaringen van Williams [79]),

[79]) R. J. Williams, J. H. Truesdail, H. H. Weinstock Jr., E. Rohrman, C. M. Lyman en C. H. Mc Burney, J. Am. Chem. Soc. **60**, 2719 (1938).

lever slechts 0.004 % pantotheenzuur bevat, maar toch het meest geschikte uitgangsmateriaal is voor de isoleering van dit zuur.

Tabel XVI

De werking van Marmite met en zonder pantotheenzuur en aneurine

Toegevoegde Marmite	Ras M						Koningsgist					
	zonder P.z. en B_1		met 1 mg P.z.		met 1 mg P.z. en 8 γ B_1		zonder P.z. en B_1		met 1 mg P.z.		met 1 mg P.z. en 8 γ B_1	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
0 mg	0	0	± 4	± 6	20	28	0	0	± 5	± 14	26	28
2,5 „	18	37	26	51	32	65	36	41	36	51	54	72
5 „	30	66	36	82	36	103	50	71	58	98	61	106
10 „	36	110	—	—	44	134	68	140	69	153	76	162

Alhoewel von Euler[33]) geen resultaat door toevoeging van mengsels van aminozuren had verkregen, meenden wij bij onze testmethode met een voedingsoplossing, die meer aan het natuurlijke gistingsmilieu is aangepast, de aminozuren als eventueele co-verbindingen niet te mogen verwaarloozen.

HOOFDSTUK IV

DE INVLOED VAN AMINOZUREN OP DE GISTING

De technische gistsoorten kunnen, afhankelijk van de kweek- en voedingsomstandigheden, een eiwitgehalte hebben, dat schommelt tusschen 22 en 67 %, terwijl ook het vet- en glycogeengehalte zeer verschillend kan zijn. Tot dusverre heeft men nog geen verband gevonden tusschen eiwitgehalte en gistingsvermogen, daar gist met hoog eiwitgehalte een geringe gisting kan veroorzaken, terwijl het omgekeerde: laag eiwitgehalte en een groote gisting, ook kan voorkomen [80]).

Dat echter een zoo belangrijk celbestanddeel als eiwit geen rol bij de gisting zou spelen, leek ons onwaarschijnlijk, temeer daar er wel een omgekeerde evenredigheid blijkt te bestaan tusschen het glycogeen- en eiwitgehalte [81]), terwijl verschillende onderzoekingen ook al een verband hebben gelegd tusschen de aanwezigheid van α-aminozuren en de groei van gist [52]) [82]) [83]). Bovendien zijn verschillende aminozuren van belang als stikstofbron voor de gist [84]).

Daar dit gedeelte van het onderzoek werd aangevangen met de bedoeling na te gaan of het mengsel pantotheenzuur-aneurine door de co-werking van een aminozuur een nog grootere activeering zou kunnen bewerkstelligen, werden drie mengsels van elk vijf verschillende aminozuren met en zonder de pantotheenzuur-aneurine-combinatie getest.

De verkregen resultaten toonden onomstootelijk aan, dat amino-

---

[80]) Zie [43]) en wel Deel I, pag. 244.

[81]) Zie [43]) en wel Deel I, pag. 254.

[82]) N. Nielsen en V. Hartelius, Biochem. Z. **295**, 211 (1938), **296**, 359 (1938) en **301**, 125 (1939).

[83]) R. J. Williams, R. E. Eakin en E. E. Snell, J. Am. Chem. Soc. **62**, 1204 (1940).

[84]) V. Hartelius, Biochem. Z. **299**, 317 (1938).

zuren — althans onder de omstandigheden, zooals wij die hadden gekozen — een effect op de gisting hadden. Vooral de aminozuren van oplossing I geven zoowel met als zonder het aneurine-pantotheenzuurmengsel een onverwacht hooge stimuleering van de gisting.

Tabel XVII

De invloed van aminozuren op de gisting met en zonder het pantotheenzuur-aneurine mengsel

Toevoeging	Koningsgist				Ras M			
	Blanco		+ 1 mg Pantotheenzuur + 8 γ B_1		Blanco		+ 1 mg Pantotheenzuur + 8 γ B_1	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
	%	%	%	%	%	%	%	%
Zonder toevoeging	0	0	21	29	0	0	27	27
0,1 cm³ oplossing I	—	—	29	81	—	—	44	67
0,2 „ „ I	11	46	29	83	16	17	58	84
0,3 „ „ I	—	—	38	97	13	18	52	88
0,1 cm³ oplossing II	—	—	33	46	—	—	—	—
0,2 „ „ II	9	24	31	63	—	—	—	—
0,3 „ „ II	—	—	30	79	—	—	—	—
0,1 cm³ oplossing III	10	11	23	37	—	—	—	—
0,2 „ „ III	14	23	27	52	—	—	—	—
0,3 „ „ III	19	28	26	64	—	—	—	—
0,1 cm³ I + 0,1 cm³ II . . .	—	—	28	86	—	—	—	—
0,2 „ I + 0,2 „ II . . .	—	—	39	104	—	—	—	—
0,3 „ I + 0,3 „ II . . .	—	—	45	116	—	—	—	—
0,1 cm³ I + 0,1 cm³ II + 0,1 cm³ III	16	50	—	—	15	21	59	70
0,2 „ I + 0,2 „ II + 0,2 „ III	15	55	—	—	25	39	69	101

Oplossing I bevatte per cm³ 1 mg: l(+)asparaginezuur, l(+)valine, l(+)isoleucine, glycine (glycocol) en l(—)tyrosine.

Oplossing II bevatte per cm³ 1 mg: l(+)glutaminezuur, l(—)leucine, dl-phenylalanine, dl-proline en l(+)arginine.

Oplossing III bevatte per cm³ 1 mg: l(+)alanine, dl-lysine, l(—)oxyproline, l(—)histidine en l(—)cystine.

Om nu een inzicht te verkrijgen in de werking van de aminozuren afzonderlijk, werden allereerst de vijftien aminozuren van bovengenoemde oplossingen elk apart onderzocht.

Aan de hand van de resultaten, die in onderstaande tabel zijn vermeld, zullen wij achtereenvolgens die aminozuren nader bespreken, welke een werking op de gisting uitoefenen.

Tabel XVIII

De invloed van aminozuren afzonderlijk op de gisting met en zonder het aneurine-pantotheenzuurmengsel

Vorm	Aminozuur	γ	Gistingsactiveering in procenten									
			Koningsgist						Ras M			
			Zonder toevoeging		+ 8 γ B_1		1 mg P.z. + 8 γ B_1		Zonder toevoeging		1 mg P.z. + 8 γ B_1	
			1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
	zonder toev. .	—	0	0	5	9	21	29	0	0	26	26
l(+)	alanine . . .	400	4	9	—	—	17	37	—	—	—	—
l(+)	arginine. . .	400	5	7	—	—	22	35	—	—	—	—
l(+)	asparaginez. .	400	14	11	—	—	34	45	—	—	—	—
l(—)	cystine . . .	400	6	5	—	—	17	28	—	—	—	—
l(+)	glutaminezuur	400	10	10	—	—	30	41	—	—	—	—
	glycine . . .	300	10	48	27	69	26	83	—	—	—	—
	„ . . .	400	—	—	—	—	—	—	2	3	30	65
l(—)	histidine . .	400	5	6	—	—	21	29	—	—	—	—
l(+)	isoleucine . .	400	—10	1	—	—	8	34	—1	5	25	30
l(—)	leucine . . .	400	9	20	—	—	25	39	—	—	—	—
dl	lysine . . .	400	0	2	—	—	23	32	—	—	—	—
l(—)	oxyproline .	400	1	4	—	—	20	28	—	—	—	—
dl	phenylalanine	400	4	4	—	—	25	29	—	—	—	—
dl	proline . . .	400	3	5	—	—	16	26	—	—	—	—
l(—)	tyrosine . .	400	—	—	—	—	—	—	7	5	24	31
l(+)	valine . . .	400	6	9	—	—	24	36	—1	4	32	34

a. Glycine (Glycocol)

Ook bij afwezigheid van het pantotheenzuur-aneurinemengsel toont glycine een zeer groote Z-activiteit *). Nog meer dan dit met pantotheenzuur-aneurine het geval is, treedt het verschijnsel

*) Wij hebben gebruik gemaakt van een meermalen gekristalliseerd glycine-preparaat en van verschillende producten van andere herkomst, zoodat een verontreiniging niet de oorzaak kan zijn van het glycine-effect.

duidelijk naar voren in het tweede uur van onze test. Bij het gebruik van Koningsgist wordt de werking van het pantotheenzuur-aneurinemengsel zelfs verre overtroffen door die van ± 300 γ glycine. Bij ras M daarentegen kunnen wij, omdat de gisting weinig stijgt bij een toevoeging van uitsluitend glycine, een co-werking van de pantotheenzuur-aneurine-combinatie aannemen of omgekeerd glycine als een co-factor beschouwen van het pantotheenzuur-aneurinemengsel.

Helaas bleek de hoedanigheid van gistras M in dit tijdvak der proefnemingen zóó onregelmatig, dat van een verder gebruik van deze gistsoort moest worden afgezien.

Het glycine-effect bij een test met Koningsgist komt heel duidelijk naar voren in onderstaande tabel, die gedeeltelijk in figuur 7 in teekening is gebracht:

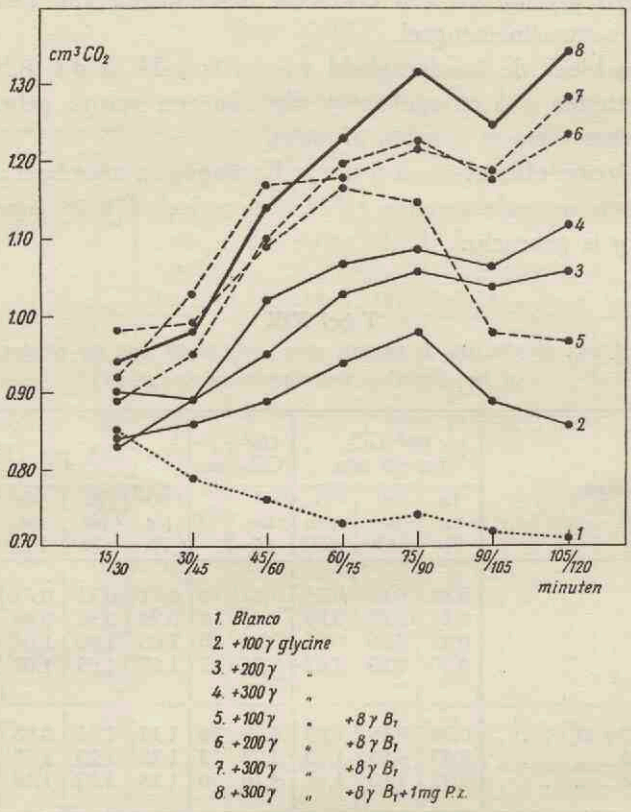
Tabel XIX

De invloed van glycine op de gisting van Koningsgist met en zonder aneurine of het aneurine-pantotheenzuur-mengsel

Toevoegingen	cm^3 CO_2 per 15 min.			cm^3 CO_2	act. in %	cm^3 CO_2 per 15 min.				cm^3 CO_2	act. in %
	15 tot 30	30 tot 45	45 tot 60	0 tot 60		60 tot 75	75 tot 90	90 tot 105	105 tot 120	60 tot 120	
Blanco	0,88	0,80	0,75	3,24	**0**	0,71	0,71	0,72	0,71	2,83	**0**
100 γ glycine	0,84	0,86	0,89	3,45	**8**	0,94	0,98	0,89	0,86	3,67	**27**
200 „ „	0,83	0,89	0,95	3,56	**11**	1,03	1,06	1,04	1,06	4,19	**45**
300 „ „	0,90	0,89	1,02	3,75	**17**	1,07	1,09	1,07	1,12	4,35	**51**
100 γ glycine + 8 γ B_1 . . .	0,98	0,99	1,09	4,08	**28**	1,17	1,15	0,98	0,97	4,27	**48**
200 „ „ + 8 „ „	0,89	0,95	1,10	3,92	**23**	1,20	1,23	1,18	1,24	4,85	**68**
300 „ „ + 8 „ „	0,92	1,03	1,17	4,16	**30**	1,18	1,22	1,19	1,29	4,88	**69**
300 γ glyc. + 8 γ B_1 + 10 γ P.z.	0,91	1,00	1,15	4,08	**28**	1,18	1,22	1,19	1,27	4,86	**68**
300 „ „ + 8 „ „ + 100 „ „	0,92	0,98	1,12	4,03	**26**	1,20	1,22	1,18	1,25	4,85	**68**
300 „ „ + 8 „ „ + 1 mg „	0,94	0,98	1,14	4,08	**28**	1,23	1,32	1,25	1,35	5,15	**78**
Blanco	0,83	0,77	0,76	3,15	**0**	0,75	0,77	0,72	0,70	2,94	**0**

Zooals reeds opgemerkt, vertoont glycine pas langzamerhand zijn volledige werking. Om dit te verklaren moeten wij denken aan een invloed op de permeabiliteit van den celwand, of aan een

opbouw door de gistcel van een voor de gisting belangrijke verbinding, waarbij glycine een rol speelt als bouwsteen. Dat de laatste veronderstelling het meest waarschijnlijk is, zou pas door het verdere onderzoek worden bewezen. Op de later weer terugloopende gistingsactiveering van 100 γ glycine komen wij nog terug.



Figuur 7

De invloed van glycine op de gisting (zie tabel XIX)

Eerst dachten wij aan de mogelijkheid, dat een pantotheenzuurderivaat met behulp van glycine en het in de cel aanwezige pantotheenzuur werd gesynthetiseerd, waarvoor 200 γ glycine meer dan voldoende was.

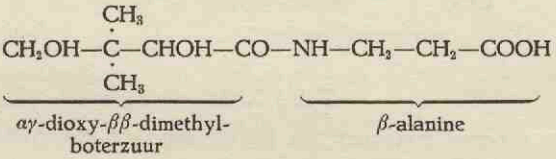
Tabel XX

De invloed van de combinatie glycine, aneurine en pantotheenzuur op de gisting

Koningsgist	Gistingsactiveering in procenten	
	1e uur	2 uur
1 mg. P.z. + 8 γ B_1 + 100 γ glycine	24	33
1 „ „ + 8 „ „ + 200 „ „	24	65
1 „ „ + 8 „ „ + 300 „ „	28	78
1 „ „ + 8 „ „ + 400 „ „	28	79
1 „ „ + 8 „ „ + 500 „ „	27	75

Zooals uit de waarden van tabel XX is te zien, wordt de werking van toegevoegd pantotheenzuur pas maximaal, als er een hoeveelheid van 1 mg dl-pantotheenzuur aanwezig is naast ± 300 γ glycine. Wanneer wij verder aannemen, dat ook bij de gisting alleen het (+)zuur werkzaam is [85] [86], dan zullen waarschijnlijk vrijwel dezelfde molaire hoeveelheden beschikbaar zijn voor een effect, dat grooter is dan dat, waartoe de cel zelf, met het daarin aanwezige pantotheenzuur, in staat is met minder dan 200 γ glycine.

Pantotheenzuur is op te bouwen uit β-alanine en $\alpha\gamma$-dioxy-$\beta\beta$-dimethylboterzuur:



[87]

Nu zou een Z-actief „nor-pantotheenzuur" in plaats van de, voor de gisting minder belangrijke, β-alanine-groep, in pantotheenzuur, glycine kunnen bevatten.

Volgens de methode van Kuhn en Wieland [88] werd de

---

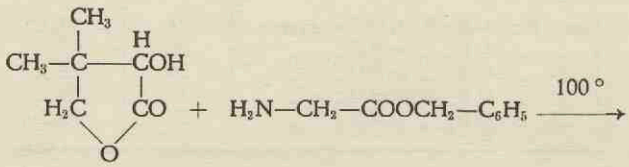
[85]) E. T. Stiller, S. A. Harris, J. Finkelstein, J. C. Keresztesy en K. Folkers, J. Am. Chem. Soc. **62**, 1784 (1940).

[86]) R. Kuhn en Th. Wieland, Ber. **73**, 1134 (1940).

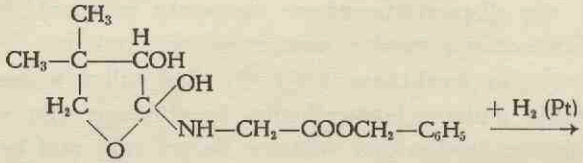
[87]) E. T. Stiller, J. C. Keresztesy, J. Finkelstein, J. Am. Chem. Soc. **62**, 1779 (1940).

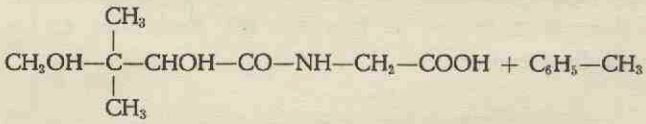
[88]) R. Kuhn en Th. Wieland, Ber. **73**, 971 (1940).

benzylester van glycine gecondenseerd met het lacton van $\alpha\gamma$-dioxy-$\beta\beta$-dimethylboterzuur. Het verkregen product, gehydreerd met platina-oxyde als katalysator, leverde het ruwe nor-pantotheenzuur op als een lichtgeel gekleurd stroopje, dat zich in de test volkomen inactief gedroeg.



$\alpha\gamma$-dioxy-$\beta\beta$-dimethyl-boterzuurlacton glycinebenzylester





„nor-pantotheenzuur" toluol

Tabel XXI

Proeven met „nor-pantotheenzuur" en het $\alpha\gamma$-dioxy-$\beta\beta$-dimethylboterzuurlacton

Koningsgist	Act. in procenten gedurende het	
	1e uur	2e uur
8 γ B_1 + 1 mg P.z. + 300 γ glycine .	26	83
8 „ „ + 1 „ „	20	34
8 „ „ *)	12	19
8 „ „ + 500 γ lacton	16	18
8 „ „ + 300 „ glycine	27	69
8 „ „ + 300 „ „ + 500 γ lacton	12	53
8 „ „ + 400 „ nor-pantotheenzuur .	9	18

*) De aneurine-activeering was na verloop van tijd grooter geworden.

Uit deze metingen konden wij besluiten, dat zoowel het lacton, als het nor-pantotheenzuur inactief is, terwijl de gistcel zelf ook niet in staat is om uit het lacton met glycine een gistingactieve stof te synthetiseeren. In verband met deze ondervinding en het feit, dat de zuivering van pantotheenzuur zelf veel tijd in beslag neemt, hebben wij er van afgezien, uit het ruwe product, zuiver nor-pantotheenzuur af te zonderen.

Een dusdanige celvermeerdering in den korten testduur als verklaring voor de grootere koolzuurontwikkeling, werd uitgesloten geacht, daar von Euler[22]) in zijn test ter bepaling van de activiteit van bios-factoren, welke in een tijdsverloop van 20—48 uren groei veroorzaken, als voedingsmilieu een oplossing gebruikte, die naast andere aminozuren ook glycine als organische stikstofbron bevatte. Ook telproeven, die wij op dezelfde wijze als voorheen met behulp van de Bürkel-Zeiss-telkamer verrichtten, benevens nephelometrische bepalingen, bewezen, dat glycine na een testduur van 2 uur geen celvermeerdering veroorzaakt.

a. Telproeven:

Blanco-beginwaarde:	289 ×	2.500.000	cellen
Blanco na het 1e uur:	280 ×	„	„
+ 400 γ glycine na het 1e uur:	285 ×	„	„
Blanco na het 2e uur:	290 ×	„	„
+ 400 γ glycine na het 2e uur:	276 ×	„	„

b. Nephelometrische bepaling:

Blanco-beginwaarde:	61.6	en 62.4 Ω,	„Groei"	0 %
Blancowaarde na het 2e uur:	70.8	„ 71.6 „	„	25 „
+ 400 γ glycine „ „ „ „ :	68.6	„ 70.6 „	„	28 „

Uit verdere proeven kregen wij nog de volgende resultaten:

1. Een hoeveelheid van meer dan 200 à 300 γ glycine veroorzaakt ook in het tweede uur geen grootere activeering.

2. De toevoeging van aneurine als co-factor kan vrij uiteenloopende resultaten opleveren. Zelfs kon bij bepaalde gistzendingen geen enkel aneurine-effect boven de aanwezige glycine-werking worden waargenomen. Bij een dergelijke gist, die dan tegelijkertijd een lage blanco-gisting vertoonde, veroorzaakte 200 γ glycine alleen een activeering van 43 % in het eerste en 59 % in het tweede uur. 1 mg glycine gaf geen verhooging van deze percentages (resp. 44 en 59 %). De verklaring van deze verschijnselen zal

moeten worden gezocht in een veranderlijk aneurinegehalte van de gist.

3. Wanneer aneurine als co-factor een invloed uitoefende op het glycine-effect, was het onverschillig of 0,5 tot 8 γ werd toegevoegd. Sindsdien werd voor die werking steeds één γ B_1 gebruikt.

4. Een gedeelte van het aneurinemolecule is niet in staat de co-werking uit te oefenen, daar bij onze proeven het 4-methyl-5β-oxyaethylthiazool het glycine-effect niet vergrootte, terwijl het 2-methyl-5-methylamine-6-aminopyrimidine daartoe slechts in zeer geringe mate in staat was. Pas wanneer zoowel het thiazool- als het pyrimidine-derivaat in de vereischte hoeveelheden werden toegevoegd, kon een effect boven dat van glycine worden waargenomen, zooals dit ook door aneurine wordt veroorzaakt. Bij de quantitatieve aneurine-test heeft Schultz [60]) met de genoemde bouwsteenen van aneurine soortgelijke ondervindingen.

5. De werking van glycine is specifiek, daar verbindingen, waarin andere eenvoudige groepen zijn gesubstitueerd, een geringer effect veroorzaakten.

In verband met dit laatste punt hebben wij behalve het reeds in tabel XVIII genoemde alanine nog onderzocht: sarkosine, betaïne, serine en de aethylester van glycine.

Tabel XXII

De invloed van sarkosine, betaïne, serine en glycine-aethylester op de gisting

Koningsgist	Hoeveelheid in γ	Act. in % gedurende het	
		1e uur	2e uur
Sarkosine	300	4	− 3
Betaïne-chloorhydraat	300	−2	3
dl-serine	200	−6	−12
Glycine-aethylester-chloorhydraat	750	3	1

De zeer geringe invloed van de glycine-aethylester op het gistingsverloop is misschien een aanwijzing voor de verklaring van de terugloopende activiteit van kleine hoeveelheden glycine (zie tabel XIX en figuur 7), die dan tijdens het gistingsproces zouden worden veresterd.

Neuberg en Lieben waren vroeger tot geheel andere gevolgtrekkingen gekomen. Wel vermeldt Neuberg[89]), zooals ook al eerder door Ehrlich[90]) was gepubliceerd, dat suiker-aminozuurmengsels met versche gist sneller vergisten dan een suikeroplossing met dezelfde gist. Voor de verklaring van dit verschijnsel onderstelt hij twee mogelijkheden.

In de eerste plaats neemt Neuberg daarvoor aan, dat er ook in een gistend mengsel een reactie optreedt tusschen aminozuren en suikers, gelijk hij die heeft waargenomen[69]) aan het snel veranderde polarisatie-vermogen van een fructose-oplossing, zoodra daaraan alanine wordt toegevoegd. Wel verloopt een dergelijke reactie in een glucose-oplossing minder snel, maar Neuberg acht het toch mogelijk, dat een aminozuur-suikerproduct sneller wordt afgebroken dan suiker alleen, alhoewel zijn proefnemingen het strikte bewijs daarvoor niet leveren.

Von Euler[91]) onderzocht dezelfde reactie van glycine in een glucose-oplossing bij verschillende zuurgraden. Ook hier verandert het draaiend vermogen van het mengsel, hoewel langzaam. De glycine-concentraties zijn echter haast vijfhonderd maal grooter dan bij onze gistingsproeven, zoodat wij eenig verband dan ook uitgesloten achten.

Bij de andere mogelijkheid, die Neuberg veronderstelt, zou de grootere koolzuurontwikkeling te wijten zijn aan een decarboxyleering van het toegevoegde aminozuur. Dit laatste is zeker niet op onze resultaten van toepassing, daar een volledige decarboxyleering van 300 γ glycine slechts ongeveer 0,1 cm^3 koolzuur oplevert.

Lieben[68]) [92]) [93]) gebruikt bij zijn gistingsproeven aminozuurconcentraties, die ongeveer tachtig maal grooter zijn dan bij ons werk het geval is. Glycine, dl-alanine en histidine vertoonen dan een gelijksoortige gistingsactiveering, die volgens onze meening vermoedelijk zal worden veroorzaakt doordat de aminozuren op-

---

89) C. Neuberg en M. Kobel, Biochem. Z. **174**, 464 (1926).
90) F. Ehrlich, Biochem. Z. **2**, 52 (1906) en **18**, 391 (1909).
91) H. v. Euler en K. Josephson, H. S. **153**, 3 (1926).
92) F. Lieben en V. Getreuer, Biochem. Z. **269**, 69 (1934).
93) F. Lieben en S. Molnar, Biochem. Z. **277**, 165 (1935).

treden als stikstofbron, want het substraat bevat uitsluitend het onderzochte aminozuur. Dit laatste kan ook gelden voor de proeven van Neuberg, want ook daar werden geen anorganische verbindingen toegevoegd.

Dat de samenstelling van het voedingsmilieu een rol speelt, veronderstelden wij reeds in den aanvang van het onderzoek; de gist is anders uitsluitend aangewezen op de stoffen, die tegelijk met de gist in de testoplossing worden gebracht. Inderdaad bleef het glycine-effect vrijwel volkomen achterwege, wanneer de gistingsproeven in een enkele glucose-oplossing werden uitgevoerd; zelfs trad bij ras M een remming van de koolzuurontwikkeling op!

Tabel XXIII
De invloed van glycine op de gisting bij afwezigheid van anorganische zouten

	Koningsgist		Ras M	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
200 γ glycine	6 %	2 %	4 %	— 17 %
400 „ „	15 „	7 „	5 „	— 23 „
600 „ „	10 „	1 „	2 „	— 27 „
800 „ „	12 „	—	2 „	— 26 „
1 mg „	16 „	2 „	5 „	— 24 „

Daar de blanco-gisting een volkomen normaal verloop had, lijkt ons een gebrek aan phosphaat als verklaring volkomen uitgesloten. In het verdere gedeelte zullen wij echter nog op dit verschijnsel terugkomen.

Alhoewel Nielsen[82]) de werking van aminozuren uitsluitend als groeifactor onderzoekt, willen wij toch op deze publicatie wijzen, daar ook hierin wordt vermeld, dat glycine geen rol speelt als groeifactor bij een 24-uurs-test, waarin naast een standaardmengsel bios het te onderzoeken aminozuur wordt toegevoegd.

b. Alanine, valine, leucine, asparaginezuur, glutaminezuur en arginine

Bovengenoemde aminozuren waren, zooals in tabel XVIII is vermeld, in staat een klein Z-effect te veroorzaken, terwijl ook eeniger-

mate de werking van aneurine en van het aneurine-pantotheenzuur-mengsel werd verhoogd.

De activeering, die door de aminozuur-mengsels I, II en III tot stand wordt gebracht, veronderstellen wij daarom de som te zijn van de werkingen, die door de aminozuren afzonderlijk kunnen worden bewerkstelligd, terwijl niet moet worden vergeten, dat de toegevoegde groote hoeveelheid organisch gebonden stikstof in die gevallen zeker een rol kan spelen.

Alanine, valine, leucine, arginine, glutaminezuur en asparaginezuur bleken zich ten opzichte van glycine niet anders te gedragen. Zelfs was de verhooging, die door de vier eerstgenoemde aminozuren werd veroorzaakt, zoo klein, dat in verband met de proeffout de additieve werking op glycine kon worden verwaarloosd.

Asparagine- en glutaminezuur toonden zich werkzamer:

Tabel XXIV

De invloed van asparaginezuur, glutaminezuur, biotine en adermine op de gisting-activeerende werking van het mengsel pantotheenzuur-aneurine-glycine

Toegevoegd aan het mengsel 1 mg P.z., 8 γ aneurine en 300 γ glycine	Koningsgist Act. in het 1e uur	Koningsgist Act. in het 2e uur
Zonder verdere toevoeging	10 %	75 %
+ 200 γ asparaginezuur	18 „	81 „
+ 400 „ „	20 „	88 „
+ 200 „ „ + 200 γ glutaminezuur	22 „	93 „
+ 400 „ „ + 200 „ „	32 „	100 „
+ 200 „ „ + 200 „ „ + 5 γ biotine	23 „	87 „
+ 200 „ „ + 200 „ „ + 10 „ „	18 „	84 „
+ 200 „ „ + 200 „ „ + 10 „ „ + 6 γ B_6	33 „	64 „
+ 200 „ „ + 200 „ „ + 10 „ „ + 20 „ „	31 „	59 „

In bovenstaande tabel hebben wij tegelijkertijd opgenomen de resultaten van een toevoeging van biotine met en zonder adermine bij de genoemde aminozuren. Vooral met adermine trad een vermindering der activeering op, een verschijnsel, waarop wij later nog terugkomen.

De resultaten van een extra toevoeging van asparagine- en glutaminezuur blijven ver achter bij de activeering, die door glycine

alleen te voorschijn wordt geroepen, hetgeen de reden was, dat het onderzoek in deze richting niet verder werd voortgezet.

Alhoewel onze veronderstelling, dat uit glycine door de gistcel „nor-pantotheenzuur" zou worden gevormd, als onjuist terzijde moest worden gelegd, blijft de mogelijkheid bestaan, dat er uit glycine een andere Z-actieve verbinding wordt gevormd, bijvoorbeeld een ander aminozuur.

Daarom werden nu nog andere ook in de natuur voorkomende aminozuren bij het onderzoek betrokken. De in onderstaande tabel vermelde verbindingen, waaronder cysteïne, dat volgens Runnström[93]) de aerobe gisting met bakkersgist sterk verhoogde, leverden echter een negatief resultaat.

Tabel XXV

De invloed van andere in de natuur voorkomende aminozuren

	Koningsgist						Ras M	
	Zonder toevoeging		+ 8 γ B_1		+ 1 mg P.z. + 8 γ B_1		+ 5 mg P.z. + 1 γ B_1	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
	%	%	%	%	%	%	%	%
Zonder toevoeging	0	0	12	19	21	29	22	55
300 γ kreatine	4	3	10	19	16	34	—	—
300 „ kreatinine	0	2	11	24	—	—	—	—
300 „ l(+)oxyglutaminezuur . .	4	7	7	15	—	—	—	—
400 „ l(—)cysteïne	0	1	—	—	—	—	14	57
300 „ dl-methionine	5	7	7	21	11	30	—	—
400 „ l(—)tryptophaan	—4	—1	8	24	—	—	—	—

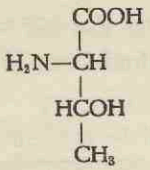
Dit was echter niet het geval met threonine, een β-oxy-α-aminozuur.

c. Threonine

Threonine is door Rose[54]) geïsoleerd als een groeifactor voor ratten.

---

[93]) J. Runnström en E. Sperber, Biochem. Z. 298, 340 (1938).



(—)threonine [94])

Voordien was deze stereoisomere vorm van α-amino-β-oxyboterzuur, die in verband met de structureele overeenkomst tot threose, threonine is genoemd, nog onbekend.

Bij de pogingen om dit aminozuur te synthetiseeren had men tot dusverre alleen het andere stereoisomeer — het zoogenaamde allothreonine — verkregen, maar het lukte tenslotte aan West ook het threonine te bereiden [95]).

Alhoewel Lash Miller, zooals wij reeds in de inleiding hebben vermeld, uit tomatensap ook een oxyaminoboterzuur meende geïsoleerd te hebben als een groeifactor voor gist, kwam hij later tot de overtuiging, dat de bios-werking van zijn product stellig niet aan threonine kon worden toegeschreven, maar door een geringe hoeveelheid β-alanine [51]) [52]) [53]) werd veroorzaakt.

Met threonine zagen wij een ander gistingsverloop als met glycine, daar in het eerste uur van de test, ook bij afwezigheid van aneurine of van het mengsel aneurine-pantotheenzuur, een uitzonderlijk hooge activeeringswaarde werd verkregen.

Aan het slot van het tweede hoofdstuk merkten wij op, dat de gistingsversnelling vooral in het eerste uur kenmerkend voor factor Z moet worden geacht.

Vandaar dat het threonine-effect aan een uitgebreid onderzoek werd onderworpen, waarvoor een synthetisch dl-threonine-preparaat

---

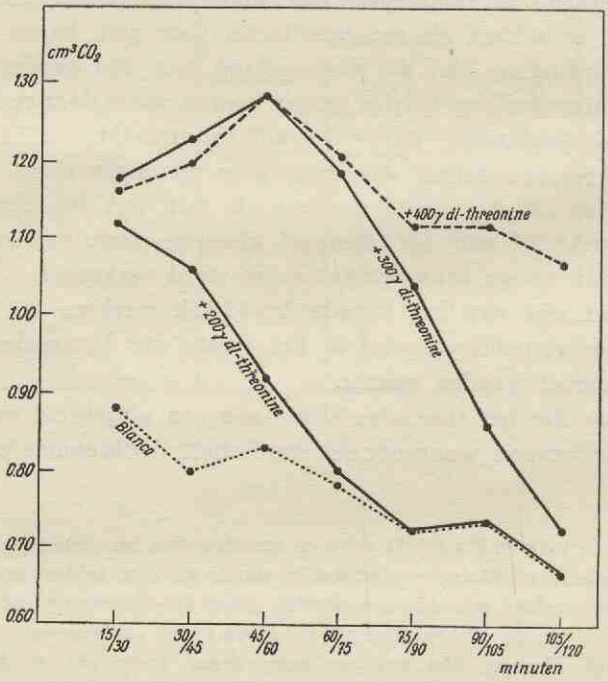
[94]) Door Meyer en Rose [54]) werd de structuur van het natuurlijke threonine — geïsoleerd uit fibrine — vastgesteld, zooals wij deze hebben geformuleerd. Zij geven echter aan dezen vorm den naam d(—)threonine naar analogie met d(—)threose, alhoewel het physiologisch tot de aminozuren moet worden gerekend. Daarom lijkt het ons beter dezen vorm aan te duiden met l(—)threonine, daar alle aminozuren met dezelfde configuratie, die in de natuur voorkomen, tot de l-reeks behooren.

[95]) H. D. West en H. E. Carter, J. Biol. Chem. **119**, 103 (1937).

werd gebruikt met een smeltpunt van 227°—229° (ongecorrigeerd), dat was bereid volgens de methode van West[95]).

Tabel XXVI
De invloed van dl-threonine op Koningsgist

Toevoeging	cm³ CO_2 per 15 min.			cm³ CO_2 1e uur	act. in %	cm³ CO_2 per 15 min.				cm³ CO_2 2e uur	act. in %
	15 tot 30	30 tot 45	45 tot 60			60 tot 75	75 tot 90	90 tot 105	105 tot 120		
50 γ dl-threonine	0,88	0,80	0,86	3,39	**1**	0,77	0,72	0,74	0,66	2,89	**0**
100 „ „	0,87	0,78	0,86	3,35	**0**	0,73	0,69	0,75	0,64	2,81	**0**
200 „ „	1,12	1,06	0,92	4,13	**23**	0,80	0,72	0,74	0,66	2,92	**1**
300 „ „	1,18	1,23	1,29	4,93	**47**	1,19	1,04	0,86	0,72	3,81	**31**
400 „ „	1,16	1,20	1,29	4,87	**45**	1,21	1,12	1,12	1,07	4,52	**56**
500 „ „	1,15	1,18	1,26	4,79	**43**	1,24	1,14	1,12	1,08	4,58	**58**
Blanco	0,88	0,80	0,83	3,35	**0**	0,78	0,72	0,74	0,66	2,90	**0**

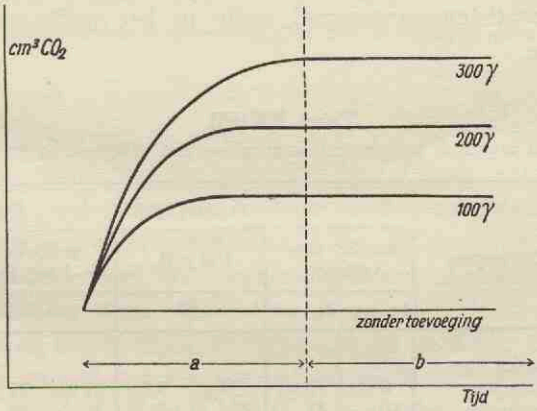


Figuur 8
De invloed van dl-threonine op Koningsgist
(200 γ, 300 γ, 400 γ en blanco-waarde uit tabel XXVI)

Uit het verloop van de gisting moesten wij de gevolgtrekking maken, dat threonine in het gistingsproces wordt afgebroken, resp. door een andere oorzaak zijn activiteit verliest (mogelijk speelt hier ook verestering, zooals bij glycine, een rol), want na verloop van twee uur of langer zakt ook de koolzuurontwikkeling van een test met 300 γ of meer dl-threonine tot de blancowaarde.

Het verschijnsel der maximale gisting zien wij hier weer terug; de maximale gistingswaarde met 200 γ of 500 γ dl-threonine is gelijk, alleen blijft die waarde bij aanwezigheid van veel threonine langer behouden.

Alhoewel, zooals reeds vermeld, het threonine door Rose[54]) als een groeifactor voor ratten was geïsoleerd, konden wij de verhoogde koolzuurontwikkeling als gevolg van celvermeerdering direct uitgesloten achten, daar het gistingsverloop in dat geval de volgende figuur op zou moeten leveren:



Figuur 9

De invloed van een hypothetischen, snelwerkenden groeifactor op de gisting

waarin a het tijdperk voorstelt, waarin groei plaats heeft met toenemende koolzuurontwikkeling en b dat met de constante koolzuurontwikkeling van de nu grootere hoeveelheid gist, waarvan de groei tot stilstand is gekomen.

Niet alleen was het verschijnsel van de na verloop van tijd terugloopende maximale gisting een steun voor onze onderstelling, ook

latere telproeven en nephelometrische bepalingen sloten elke door threonine veroorzaakte celvermeerdering uit [53]).

Tabel XXVII

Threonine is voor gist geen groeifactor.

	Aantal cellen	Nephelometr. waarde	„Groei"
Beginwaarde	260 × 2500000	58,7 Ω	0 %
„	271 × 2500000	59,3 „	
Blanco na 5 uur . . .	277 × 2500000	66,9 „	27 „
„ „ 5 „ . . .	262 × 2500000	65,6 „	23 „
500 γ dl-threonine na 5 u.	271 × 2500000	65,4 „	23 „

Het threonine-effect bleek, alhoewel iets minder dan dit bij glycine het geval was, nog te versterken, wanneer aneurine en het aneurine-pantotheenzuurmengsel mede in het gistingsmilieu aanwezig waren:

Tabel XXVIII

De invloed van aneurine en pantotheenzuur op het glycine- en threonine-effect

Toevoeging	Koningsgist					
	zonder toevoeging		+ 8 γ B_1		+ 8 γ B_1 + 1 mg P.z.	
	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur	1e uur	2e uur
zonder toevoeging	0 %	0 %	5 %	9 %	21 %	29 %
300 γ glycine	10 „	48 „	27 „	69 „	26 „	83 „
300 „ dl-threonine	42 „	32 „	49 „	39 „	61 „	55 „

Ofschoon dus glycine en threonine wel in hun gistingversnellende werking een verschillend gedrag toonden, was de benoodigde hoeveelheid voor het verkrijgen van een maximale gisting van dezelfde grootte. Daar wij toen al eenig verband veronderstelden tusschen het glycine- en threonine-effect, hebben wij verschillende combinaties van de twee aminozuren onderzocht, waarvan de voornaamste resultaten in tabel XXIX zijn ondergebracht.

Tabel XXIX

De invloed van glycine op het threonine-effect en omgekeerd

Koningsgist	zonder toevoeging		50 γ dl-threonine *)		100 γ dl-threonine		200 γ dl-threonine		300 γ dl-threonine		400 γ dl-threonine	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
Zonder toevoeging	0 %	0 %	1 %	0 %	0 %	0 %	23 %	1 %	47 %	31 %	45 %	56 %
50 γ glycine	—	—	1 „	1 „	15 „	4 „	47 „	44 „	—	—	43 „	50 „
100 „ „	8 „	27 „	6 „	10 „	27 „	19 „	41 „	52 „	—	—	43 „	50 „
200 „ „	11 „	45 „	—	—	42 „	68 „	—	—	—	—	—	—
300 „ „	17 „	51 „	—	—	30 „	50 „	—	—	42 „	54 „	—	—
100 γ glycine + 1 à 8 γ B_1	28 %	48 %	21 %	37 %	45 %	55 %	52 %	68 %	50 %	69 %	49 %	70%
200 „ „ + 1 „ 8 „ „	23 „	68 „	32 „	56 „	44 „	69 „	47 „	68 „	47 „	67 „	46 „	68 „
300 „ „ + 1 „ 8 „ „	30 „	69 „	—	—	44 „	63 „	—	—	—	—	—	—
400 „ „ + 1 „ 8 „ „	—	—	—	—	43 „	64 „	43 „	64 „	—	—	—	—
600/800 „ + 1 „ 8 „ „	—	—	—	—	41 „	64 „	—	—	44 „	67 „	—	—

*) Kleinere hoeveelheden dl-threonine (tot 0,4 γ) hadden geen waarneembare werking.

Speciaal willen wij de aandacht vestigen op het feit, dat 100 γ dl-threonine gedurende den geheelen duur van de test de koolzuurontwikkeling niet verhoogt, althans niet waarneembaar; 200 γ glycine geeft een activeeringswaarde van 11 en 45 %, resp. in het eerste en tweede uur. De combinatie echter stimuleert de gisting tot 42 en 68 %.

Omgekeerd geeft 200 γ dl-threonine 23 en 1 %, 100 γ glycine 8 en 27 %, terwijl het mengsel 41 en 52 % bereikt.

Van een additief effect is hierbij geen sprake, zoodat dit resultaat een steun is voor onze opvatting, dat de glycine- en threonine-werking op een of andere wijze met elkander in verband staan.

Uit slechts enkele proeven, die nog met gistras M konden worden verricht, bleek dat het threonine-effect ook bij gebruik van deze gistsoort van dezelfde grootte was, dit in tegenstelling met glycine (zie tabel XVIII), waarbij voor een gistingsactiveering zooals bij Koningsgist minstens 2 tot 8 γ aneurine werd vereischt.

Of er behalve aneurine nog andere stoffen een belangrijke co-werking kunnen uitoefenen op het glycine-threonine-effect, moest

Tabel XXX

De invloed van andere verbindingen op het glycine-threonine-aneurine-effect bij Koningsgist. (De gistingsactiveering is in procenten vermeld.)

Toevoeging	zonder toevoeging		100 γ dl-threonine 300 γ glycine 1 γ B_1		100 γ dl-threonine 200 γ glycine 1 γ B_1		100 γ dl-threonine 100 γ glycine 1 γ B_1		300 γ dl-threonine	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
Zonder toevoeging . .	0	0	44	63	44	69	45	55	42	32
8 γ pantotheenzuur .	—	—	—	—	*43*	*68*	—	—	—	—
16 „ „ .	—	—	—	—	*42*	*66*	—	—	—	—
32 „ „ .	—	—	—	—	*40*	*61*	—	—	—	—
62 „ „ .	—	—	—	—	*41*	*68*	*45*	*61*	—	—
125 „ „ .	—	—	—	—	—	—	*39*	*54*	—	—
250 „ „ .	—	—	—	—	—	—	*43*	*59*	—	—
5 γ biotine-methylester	—	—	—	—	34	47	—	—	—	—
20 „ „	—	—	—	—	39	55	—	—	—	—
1 γ adermine	—	—	—	—	*29*	*27*	—	—	—	—
2 „ „	—	—	—	—	*23*	*23*	—	—	—	—
4 „ „	—	—	—	—	*28*	*24*	—	—	—	—
1 γ nicotinezuuramide	—	—	—	—	*43*	*70*	—	—	—	—
2 „ „	—	—	—	—	*48*	*71*	—	—	—	—
4 „ „	—	—	—	—	*50*	*72*	—	—	—	—
2 γ lactoflavine . . .	3	6	—	—	—	—	—	—	42	34
0,1 cm^3 bios-fact.-opl. *)	16	21	—	—	—	—	—	—	*28*	*12*
0,2 „ „ .	30	30	—	—	—	—	—	—	*36*	*15*
0,3 „ „ .	—	—	—	—	—	—	—	—	*34*	*20*
0,4 „ „ .	35	36	—	—	—	—	—	—	*36*	*21*
0,5 „ „ .	32	40	—	—	—	—	—	—	—	—
0,8 „ „ .	53	55	—	—	—	—	—	—	—	—
300 γ glutaminezuur . .	—	—	34	66	—	—	—	—	—	—
400 „ „ . .	10	10	34	79	—	—	—	—	—	—
600 „ „ . .	—	—	21	70	—	—	—	—	—	—
25 γ cysteïne	—	—	—	—	45	65	—	—	—	—
100 „ „	—	—	—	—	38	59	—	—	—	—
400 „ „	—	—	—	—	44	63	—	—	—	—
35 γ aminozuren **) .	—	—	—	—	*45*	*72*	—	—	—	—
70 „ „ .	—	—	—	—	*45*	*69*	—	—	—	—
140 „ „ .	—	—	—	—	*43*	*68*	—	—	—	—
280 „ „ .	—	—	—	—	*45*	*68*	—	—	—	—

De cursief gedrukte getallen duiden activeeringspercentages aan, die berekend zijn op de gemiddelde waarden van het glycine-threonine-aneurine-effect, daar vermoedelijk tengevolge van een afwijkende gistkwaliteit, de gistingsstimuleering van alle Z-actieve stoffen bij deze proeven ver boven het normale niveau lag.

*) De oplossing van de bios-factoren bevatte per 0,1 cm^3: 0,5 γ adermine, 0,5 γ aneurine, 1,25 γ biotine-methylester, 25 γ meso-inosiet en 250 γ pantotheenzuur-natrium.

**) De oplossing van de aminozuren bevatte gelijke gewichtshoeveelheden van de volgende zeven aminozuren: l(+)alanine, l(+)asparaginezuur, l(+)glutaminezuur, l(−)leucine, l(+)isoleucine en l(+)valine.

aan de hand van de volgende proeven ontkennend worden beantwoord.

De geringe werking van een extra toevoeging van een vrij groote hoeveelheid pantotheenzuur is al besproken (zie tabel XXVIII), maar ook biotine, adermine, nicotinezuuramide, lactoflavine en mengsels van bios-factoren of aminozuren versterkten het effect niet in belangrijke mate, zooals in tabel XXX is te zien.

Het is vooral opvallend, dat adermine, biotine, evenals het mengsel bios-factoren de waarneembare koolzuurontwikkeling van een door threonine-glycine geactiveerde gisting doen verminderen! Wij hadden dit verschijnsel van gistingsremming al eerder opgemerkt (zie pag. 39 en 59), wanneer een groeibevorderende factor werd toegevoegd. Als verklaring kunnen wij aannemen, dat de cellen onder invloed van bepaalde bios-factoren het koolzuur, dat anders zou vrijkomen, of het pyrodruivenzuur, in staat zijn te benutten voor den opbouw van verbindingen, die de celdeeling voorbereiden, zoodat wij dan van een schijnbaar verminderde gisting moeten spreken. Voor deze veronderstelling zou de waarneming pleiten, dat bij een dergelijke proef inderdaad in totaal minder koolzuur ontwijkt, want wanneer wij de proeven voortzetten totdat de koolzuurontwikkeling door suikergebrek eindigt, heeft een mengsel met 500 γ dl-threonine ongeveer 15,7 cm^3 CO_2 geleverd, terwijl als er bovendien 0,5 cm^3 van het bovengenoemde mengsel bios-factoren wordt toegevoegd, slechts in totaal na een langeren gistingsduur 14,2 cm^3 CO_2 wordt verkregen.

Daar wij echter nog over te weinig gegevens beschikken, moet een definitief oordeel omtrent het verband tusschen groei en gisting worden opgeschort tot een verder, speciaal daarop ingesteld, onderzoek hierop een antwoord zal geven.

Vanzelfsprekend kwam nu weer de vraag naar voren of het mengsel threonine-glycine-aneurine een plaats kan innemen in het complex verbindingen, dat in het door ons gebruikte Marmite werkzaam is. Een soortgelijke test, zooals wij vroeger reeds bij het mengsel aneurine-pantotheenzuur (zie tabel XVI pag. 47) hebben toegepast, zou op de bovengestelde vraag een antwoord kunnen geven.

Tabel XXXI

Het glycine-threonine-effect in vergelijking met dat van Marmite

Koningsgist	Zonder toevoeging		50 γ dl-threonine 100 γ glycine 0,5 γ aneurine		100 γ dl-threonine 200 γ glycine 1 γ aneurine		200 γ dl-threonine 400 γ glycine 2 γ aneurine	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
Zonder toevoeging	0 %	0 %	24 %	44 %	40 %	63 %	43 %	63 %
1 mg Marmite . .	5 „	5 „	—	—	43 „	69 „	—	—
2 „ „ . .	28 „	25 „	—	—	49 „	73 „	—	—
3 „ „ . .	36 „	37 „	—	—	66 „	90 „	—	—
5 „ „ . .	58 „	66 „	—	—	—	—	—	—
7 „ „ . .	73 „	95 „	—	—	—	—	—	—

De verkregen resultaten laten zien, dat de werking van ongeveer 4 mg Marmite overeenkomt met die van 100 γ dl-threonine — 200 γ glycine — 1 γ aneurine.

De dubbele concentratie van dit mengsel geeft echter geen grootere gistingsstimuleering, terwijl dit bij Marmite wel het geval is. Dit laatste zal echter kunnen worden geweten aan de samenwerking van de talrijke bestanddeelen van gistkooksap zooals pantotheenzuur, asparaginezuur, glutaminezuur enz. (zie tabel XXIV), terwijl ook celvermeerdering een rol zal spelen (zie tabel IV). Overigens achten wij het geenszins uitgesloten, dat er nog altijd onbekende factoren mede in gistkooksap aanwezig zijn, welke door een onderzoek met andere gistrassen waarschijnlijk zullen kunnen worden geïdentificeerd.

Beschouwen wij het threonine-glycine-aneurinemengsel (301 γ) quantitatief ten opzichte van Marmite (4 mg), dan is dit physiologisch geenszins onmogelijk, want het zou wijzen op een gehalte aan gistingactieve stoffen in Marmite van ongeveer 6 %, waarvan hoogstens 1 % natuurlijk threonine *). In verband met de moeilijke

*) Wij veronderstellen alleen het natuurlijke (—)threonine Z-actief. Dit wordt gesteund door de waarneming dat 100 γ glycine, welke hoeveelheid theoretisch 159 γ (—)threonine zal kunnen leveren, in het tweede uur van de test 27 % gistingsversnelling geeft, terwijl 200 γ dl-threonine, dat met 100 γ (—) overeenkomt, in het eerste uur de gisting met 23 % verhoogt. Het eigenlijke bewijs zal pas kunnen worden geleverd, als in een volgend onderzoek de vier optisch actieve isomeren van α-amino-β-oxyboterzuur zullen worden beproefd.

isoleering van threonine uit natuurproducten[54]), hebben wij er — althans voor de bewerking van dit proefschrift — van afgezien om threonine uit Marmite te isoleeren, daargelaten dat een dergelijk onderzoek toch niet de vraag zal kunnen beantwoorden hoe groot het threoninegehalte in Marmite is.

d. Het verband tusschen het glycine- en threonine-effect

Zooals wij reeds hebben aangeduid, veronderstellen wij dat de latente werking van glycine in het eerste uur van onze test, een aanwijzing is voor de synthese van een Z-actieve verbinding, waarbij glycine als bouwsteen fungeert. Na de mislukte proeven met norpantotheenzuur lag het voor de hand nu aan een dergelijk verband met threonine te denken. Het verschil in moleculairgewicht van threonine en glycine is 44, hetgeen overeenkomt met dat van aceetaldehyde, een der belangrijkste tusschenproducten bij het gistingsproces.

Nu is geheel synthetisch door een onderzoek van Carter[95]) de vorming van dl-threonine uit hippuurzuur en aceetaldehyde mogelijk geworden, waarbij het „azlacton" van benzoyl-α-aminocrotonzuur als tusschenproduct optreedt.

Het verloop van een bio-synthese, waarbij uit glycine en aceetaldehyde threonine wordt gevormd, kunnen wij ons op twee manieren voorstellen, analoog aan een paar bio-synthesen, die met stikstofvrije verbindingen zijn uitgevoerd:

1. De koppeling onder invloed van een „aldolase"

Het gelukte aan Meyerhof[96]) om in weefselextracten, vooral van gist en spierweefsel, dioxyacetonphosphorzuur en aldehyden te vereenigen tot ketophosphorzuren met een langeren koolstofketen. Dit zou geschieden onder den invloed van een „aldolase". Wanneer wij het schema, van de vorming van methyltetrosephosphaat uit dioxyacetonphosphorzuur en aceetaldehyde in een met fluoride vergiftigde gisting, op ons geval toepassen, kunnen wij dit

---

95) H. E. Carter, P. Handler en D. B. Melville, J. Biol. Chem. **129**, 359 (1939).

96) O. Meyerhof, K. Lohmann en P. H. Schuster, Biochem. Z. **286**, 301 (1936).

als volgt formuleeren, waarbij een onbekend biochemisch derivaat van glycine de plaats van het dioxyacetonphosphorzuur in zal moeten nemen.

2. De koppeling als een „acyloïne"-synthese

Uit onderzoekingen van Neuberg[97]) is bekend, dat aceetaldehyde tijdens de gisting, dus in „statu nascendi", een soort aldol-condensatie kan geven met aldehyden, zelfs met aldehyden, die in physiologische processen geen rol spelen, zooals:

benzaldehyde aceetaldehyde l-phenylacetylcarbinol

Voor een dergelijke reactie is het aceetaldehyde in „statu nascendi" vereischt, daar benzaldehyde en synthetisch aceetaldehyde in een waterige gistsuspensie niet met elkaar reageeren, terwijl de toevoeging van synthetisch aceetaldehyde bij een overmaat benzaldehyde in een gistend mengsel niet de opbrengst van phenylacetylcarbinol vergroot, maar de synthese van acetoïne CH_3-CHOH-CO-CH_3, uit een mol. toegevoegd aceetaldehyde en een mol. aceetaldehyde in „statu nascendi", mogelijk maakt.

Neuberg schrijft dit soort reacties toe aan een „carboligase", terwijl Dirscherl[98]) en Langenbeck[99]) deze „acyloïne"-synthesen willen verklaren als carboxylase-werkingen.

Eenvoudigheidshalve kiezen wij voor de formuleering van het

---

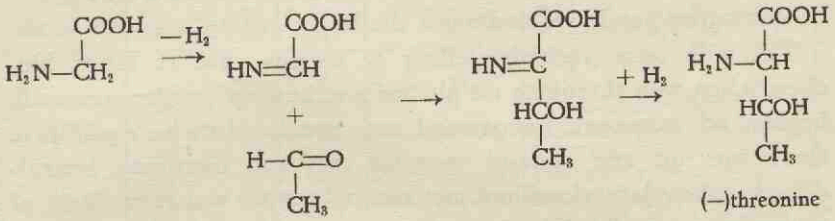
[97]) C. Neuberg en J. Hirsch, Biochem. Z. **115**, 282 (1921); **128**, 608 en 618 (1922).

[98]) W. Dirscherl en A. Schöllig, H. S. **252**, 53 en 70 (1938) en vroegere mededeelingen.

[99]) W. Langenbeck, H. Wrede en W. Schlokkermann, H. S. **227**, 263 (1934).

veronderstelde reactieverloop met glycine het schema van Neuberg.

Onder den invloed van een dehydrase en een ander ferment zou het glycine als een iminoglyoxylzuur met het aceetaldehyde in „statu nascendi" kunnen reageeren. Wordt het condensatieproduct daarna weer gehydreerd, dan is er threonine gevormd volgens het reactie-schema:



Wij nemen op het oogenblik aan, dat alleen het natuurlijke (—)threonine, zooals dit door Rose[54]) is geïsoleerd uit fibrine, wordt gevormd; als zoodanig hebben wij dit steeds geformuleerd.

Dat de imino-verbindingen wel degelijk in het gistende mengsel aanwezig kunnen zijn, kan worden afgeleid uit het reeds eerder vermelde feit, dat glycine alleen dan zijn werking uitoefent, indien ook anorganische zouten in het substraat aanwezig zijn (zie tabel XXIII).

Von Euler[100]) vermeldt daaromtrent, dat in biochemische oplossingen de concentratie van iminocarbonzuren in belangrijke mate wordt beïnvloed door de aanwezigheid van NH_4-zouten, waardoor het evenwicht tusschen het iminocarbonzuur en het o.i. voor de gisting minder belangrijke ketocarbonzuur[101]) ten gunste van de iminoverbinding wordt verschoven.

---

100) H. von Euler, E. Adler, G. Günther en N. B. Das, H. S. **254**, 61 (1938).

101) C. Neuberg, Biochem. Z. **71**, 135 (1915).

Dat de door ons gebruikte voedingsoplossing inderdaad de benoodigde hoeveelheid ammoniumzouten bevatte, bleek wel toen door een verdubbeling van de dosis anorganische zouten in de voedingsoplossing vrijwel geen verandering in het glycine-effect viel waar te nemen.

Tevens toonden deze proeven, dat het door ons gebruikte voedings-substraat ten opzichte van de gebruikte hoeveelheid gist ook voldoende calcium bevatte, dat volgens Hennenberg[102]) de gistingremmende verbindingen, die bij de gisting ontstaan, bindt.

Teneinde onze veronderstelling te toetsen, dat er langs biochemischen weg threonine uit glycine zou kunnen worden gevormd, hebben wij pogingen aangewend om, zooals Neuberg[103]) in staat was uit een gistend mengsel met een overmaat benzaldehyde, phenylacetylcarbinol met een opbrengst van ruim 20 % af te zonderen, op dezelfde wijze, uitgaande van een groote hoeveelheid glycine, threonine te verkrijgen, waarbij aan het substraat de gebruikelijke anorganische zouten werden toegevoegd. Deze reacties leverden echter een negatief resultaat, want de verkregen ruwe, grootendeels wel gekristalliseerde, producten uit de gecentrifugeerde gistingsoplossingen vertoonden bij onze test nagenoeg alleen het glycine-effect, zoodat wij moesten concludeeren, dat er geen threonine buiten de cellen aanwezig is. Ook bestaat de mogelijkheid, dat het threonine in een zoo kleine hoeveelheid wordt gevormd, dat de isoleering op dezelfde bezwaren stuit, zooals wij die voor de verwerking van Marmite nader hebben toegelicht, terwijl de bekende analytische methoden[104]) [105]) vrijwel ongeschikt zijn om het eventueel gevormde threonine in de oplossingen aan te toonen.

Dat echter wel een dergelijke bio-synthese waarschijnlijk is, konden wij afleiden uit een proef waarbij, pas nadat een door

---

[102]) Zie [43]) en wel Deel I, pag. 196.

[103]) C. Neuberg en H. Ohle, Biochem. Z. **128**, 610 (1922).

[104]) T. Higasi, S. Mayeda en H. Matsuoka, Scient. Pap. Inst. Physic and Chem. Research, **35**, 170 (1939).

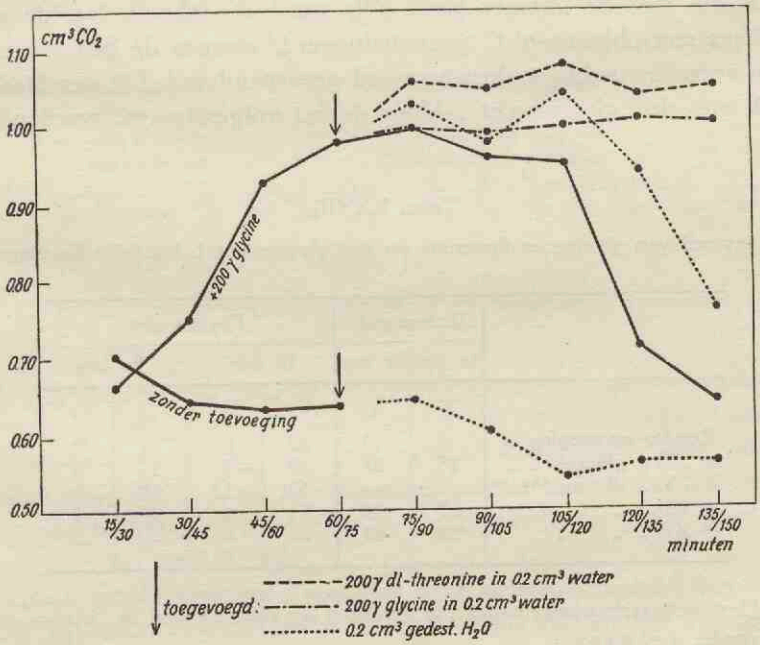
[105]) R. J. Block, D. Bolling en M. Webb, J. Biol. Chem. **133**, Scient. Proc. XIV (1940).

glycine gestimuleerde gisting was ontstaan, threonine werd toegevoegd.

Tabel XXXII

De werking van threonine op door glycine geactiveerde Koningsgist

	cm³ CO_2 per 15 min.			cm³ CO_2 in het 1e uur	Act. in %	Na het 1e uur wordt 0,2 cm³ oplossing toegevoegd	cm³ CO_2 per 15 min.				cm³ CO_2	Act. in %	cm³ CO_2
	15 tot 30	30 tot 45	45 tot 60				75 tot 90	90 tot 105	105 tot 120	120 tot 135	75 tot 135		135 tot 150
Blanco . . .	0,74	0,66	0,64	2,72	0	gedest. H_2O	—	—	—	—	—	—	—
„ . . .	0,70	0,64	0,65	2,65		„ „	0,64	0,60	0,54	0,56	2,34	0	0,56
200 γ glycine	0,66	0,74	0,94	3,12	19	200 γ glycine	1,02	1,02	1,02	1,04	4,10	71	1,03
200 „ „	0,62	0,74	0,87	2,97		200 „ „	0,98	0,96	0,98	0,97	3,89		0,98
200 „ „	0,68	0,77	0,94	3,19		200 „ threonine	1,07	1,05	1,06	1,03	4,21	80	1,03
200 „ „	0,67	0,77	0,93	3,16		200 „ „	1,05	1,04	1,09	1,06	4,24		1,07
200 „ „	0,66	0,76	0,92	3,12		gedest. H_2O	1,02	0,99	1,03	0,96	4,00	70	0,82
200 „ „	0,69	0,76	0,94	3,19		„ „	1,04	0,97	1,05	0,91	3,97		0,71
200 „ „	0,68	0,75	0,91	3,12		zonder toev.	1,00	0,97	0,95	0,71	3,63	55	0,64



Figuur 10

De werking van threonine op door glycine geactiveerde Koningsgist

Vooral figuur 10, die tabel XXXII in beeld brengt, geeft duidelijk aan, dat een toevoeging van threonine vrijwel geen verdere stimuleering van een door glycine geactiveerde gisting veroorzaakt, maar deze van langeren duur doet zijn, hetgeen ook het geval is bij een toevoeging van meer glycine.

Verder gelukte het ons om aan te toonen, dat het eventueel gevormde threonine de gistcel niet verlaat, door een proef op de volgende wijze uit te voeren:

Twee gelijke hoeveelheden Koningsgist (250 mg) werden gesuspendeerd in elk 5 cm^3 van de gebruikelijke voedingsoplossing. Bij het eene gedeelte werd 2 mg glycine in 5 cm^3 gedestilleerd water toegevoegd („glycine-gist"), terwijl het andere gedeelte van dezelfde hoeveelheid gedestilleerd water werd voorzien („blanco-gist"). Deze gistsuspensies werden elk gelijk over vijf kolfjes verdeeld en op de gewone wijze bij 30° in een thermostaat gedurende 75 minuten geschud. Op dat tijdstip vertoonden de kolfjes met de „glycine-gist" een ongeveer 50 % grootere koolzuurontwikkeling dan die met de „blanco-gist". Nu werd de inhoud van de vijf kolfjes met „blanco-gist" gecentrifugeerd, waarna de gist weer in een versche voedingsoplossing werd gesuspendeerd. Dit geschiedde ook met de „glycine-gist". Voor de nu volgende test werden de

Tabel XXXIII

De invloed van glycine en threonine op met glycine voorbehandelde Koningsgist

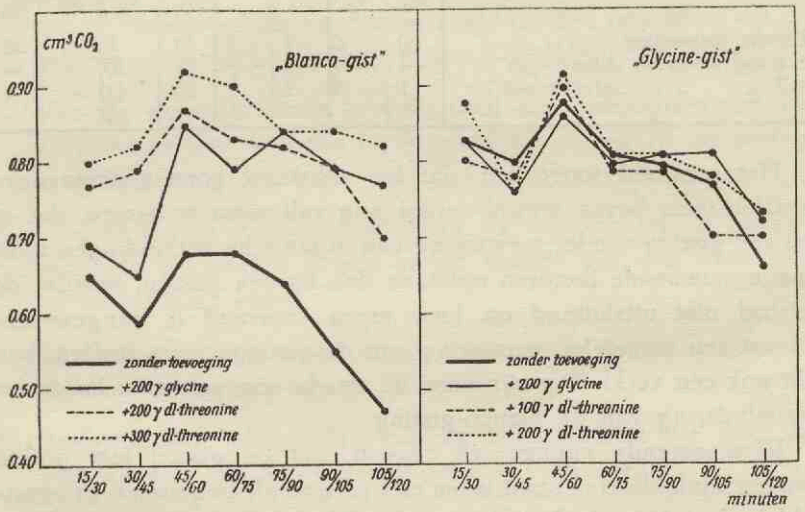
	„Blanco-gist"		„Glycine-gist"			
	1e uur	2e uur	1e uur		2e uur	
	%	%	% *)	% **)	% *)	% **)
Zonder toevoeging .	0	0	32	0	31	0
+ 200 γ glycine . .	15	37	29	−2	35	3
+ 100 „ dl-threonine	—	—	30	−1	28	−2
+ 200 „ „ „	27	35	34	1	35	3
+ 300 „ „ „	33	42	—	—	—	—

*) Deze activeeringspercentages zijn berekend ten opzichte van de „blanco-gist" zonder toevoeging.

**) Deze activeeringspercentages zijn berekend ten opzichte van de „glycine-gist" zonder toevoeging.

beide suspensies elk weer over vijf kolfjes verdeeld, zoodat de „blanco-" en „glycine-gist" de gebruikelijke versche Koningsgist vervingen.

In figuur 11 zijn de elk kwartier gemeten waarden aan ontweken koolzuur uitgezet, zoodat daarin duidelijk is te zien, dat de „glycine-gist" met of zonder toevoeging vrijwel dezelfde koolzuur-ontwikkeling geeft, terwijl de „blanco-gist" met threonine direct, of met glycine na 60 minuten, hetzelfde niveau bereikt.



Figuur 11

De invloed van glycine en threonine op voorbehandelde Koningsgist

Voor de bepaling van een nog eventueel aanwezige hoeveelheid glycine of van gevormd threonine in de substraat-oplossingen werden in een andere proef met versche koningsgist deze vloeistoffen onderzocht. Daar in deze proef meer vloeistof dan gewoonlijk werd toegevoegd, moest het testmilieu voor dit geval worden vergroot van 2 op 3,3 cm³.

Zooals uit de verkregen waarden voor threonine zonder een van beide substraat-vloeistoffen is te zien, heeft dit op het resultaat weinig invloed. Vanzelfsprekend werd zorg gedragen dat in deze grootere hoeveelheid voedingsoplossing de concentratie van suiker

en anorganische zouten zooveel mogelijk dezelfde was als bij de gebruikelijke proeven met 2 cm³.

Tabel XXXIV

De invloed van den substraat-vloeistof op de gisting

	zonder toevoeging		+ 100 γ dl-threonine		+ 200 γ dl-threonine		+ 300 γ dl-threonine	
	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.	1e u.	2e u.
	%	%	%	%	%	%	%	%
Zonder toevoeging	0	0	9	4	40	0	54	32
+ 2 cm³ substraat „blanco-gist" .	− 4	− 11	− 1	− 9	12	− 10	—	—
+ 2 „ „ „glycine-gist" .	1	− 2	9	0	50	41	—	—

Het resultaat toont aan, dat het substraat geen gistingactieve stoffen meer bevat, terwijl verder nog valt waar te nemen, dat er bij een gisting zonder toevoeging van organische verbindingen meer gistingremmende factoren ontstaan dan bij een gisting, waarbij de gistcel niet uitsluitend op haar eigen voorraad is aangewezen. Naast een mogelijke verestering van de gistingactieve stoffen, kan dit ook een verklaring zijn voor de steeds waargenomen langzame vermindering van de blanco-gisting.

Resumeerende kunnen wij zeggen, dat de gistcel met groote waarschijnlijkheid in staat is om met glycine als bouwsteen en aceetaldehyde resp. pyrodruivenzuur de Z-factor threonine te vormen, die in de cel blijft, althans niet in waarneembare hoeveelheden aan het substraat wordt afgegeven. Mogelijk speelt bij dien opbouw het aneurine een rol.

Over de wijze, waarop threonine en glycine het verloop van de alcoholische gisting versnellen valt nog niets met zekerheid te zeggen. Het is mogelijk, dat onder de physiologische omstandigheden der gisting reeds bij 30° het threonine als zoodanig de decarboxyleering van pyrodruivenzuur door de carboxylase kan versnellen [106]), terwijl ook de mogelijkheid bestaat, dat het threonine van belang is voor den opbouw van proteïnen, die bij de gisting een rol spelen.

---

[106]) Vergelijk: W. Dirscherl en H. Nahm, H. S. **264**, 41 (1940).

SAMENVATTING

1. Een vergelijkend onderzoek werd ingesteld naar de bruikbaarheid van verschillende gistsoorten voor een test, ter bepaling van verbindingen, die een versnellende invloed uitoefenen op de gewone alcoholische gisting (factor Z-werking).

2. Van de thans bekende bios-factoren zijn pantotheenzuur en aneurine in staat om ook bij Koningsgist en ras M de gisting te stimuleeren.

3. Glycine is een Z-factor, waarvan de werking bij de bovenvermelde gistsoorten vooral in het tweede uur van onze test tot uitdrukking komt.

4. Threonine is reeds in het eerste uur van de test voor dezelfde gistsoorten een zeer actieve Z-factor.

5. Aneurine kan, afhankelijk van de hoedanigheid der gist, de werking van glycine en threonine nog verhoogen.

6. Het is hoogst waarschijnlijk, dat in de gistcel een bio-synthese plaats vindt van glycine met aceetaldehyde resp. pyrodruivenzuur tot threonine, waardoor de latente werking van glycine in het eerste uur van de test wordt verklaard.

7. Glycine en threonine zijn voor Koningsgist en ras M geen groeifactoren.

INHOUD

STELLINGEN

I

Het is zeer waarschijnlijk, dat er tijdens de alcoholische gisting een bio-synthese plaats vindt van glycine tot het natuurlijke threonine.

II

De methode, waarop Nielsen en Hartelius de werking van aminozuren als groeistof voor gist hebben onderzocht, wettigt niet geheel de conclusies van dat onderzoek.

N. Nielsen en V. Hartelius, Biochem. Z. **295**, 211 (1938).
N. Nielsen en V. Hartelius, Biochem. Z. **301**, 125 (1939).

III

Bredée heeft aangetoond, dat Lieser en Schramek niet hebben bewezen, dat uitsluitend micellaire oppervlakte-reacties voorkomen bij de vorming van xanthogenaat uit alkalicellulose.

H. L. Bredée, Kolloid Z. **94**, 81 (1941).

IV

De formuleeringen van Planck voor het volume en de energie van verdunde oplossingen worden door Fredenhagen verkeerd geinterpreteerd.

M. Bodenstein, K. F. Bonhoeffer en G. Joos, Z. physik. Chem. (B) **47**, 288 (1940).
K. Fredenhagen, Z. physik. Chem. (B) **40**, 51 (1938).
K. Fredenhagen en E. Tramitz, Z. physik. Chem. (B) **47**, 291 (1940).

W. A. J. BORG

V

De physiologische eigenschappen van α-tocopherol hangen nauw samen met de constitutie van de zijketen.

P. Karrer en K. S. Yap, Helv. Chim. Acta **23**, 581 (1940).

VI

De synthesen volgens Mannich leiden niet tot o-methyleen-cyclohexanon, maar tot een dimeer product.

K. Dimroth, K. Resin en H. Zetsch, Ber. **73**, 1399 (1940).

VII

De bromeering van thiazool aan C_2 moet bij hooge temperatuur geschieden.

E. Ochiai en F. Nagasawa, Ber. **72**, 1470 (1939).
J. P. Wibaut, Ber. **72**, 1708 (1939).

VIII

De door Noga opgestelde constitutieformule van iso-nicoteïne is aan ernstige bedenkingen onderhevig.

E. Späth en S. Biniecki, Ber. **72**, 1809 (1939).