



J. H. SCHUURMANS STEKHOVEN.

SACCHAROMYCES KEFYR.



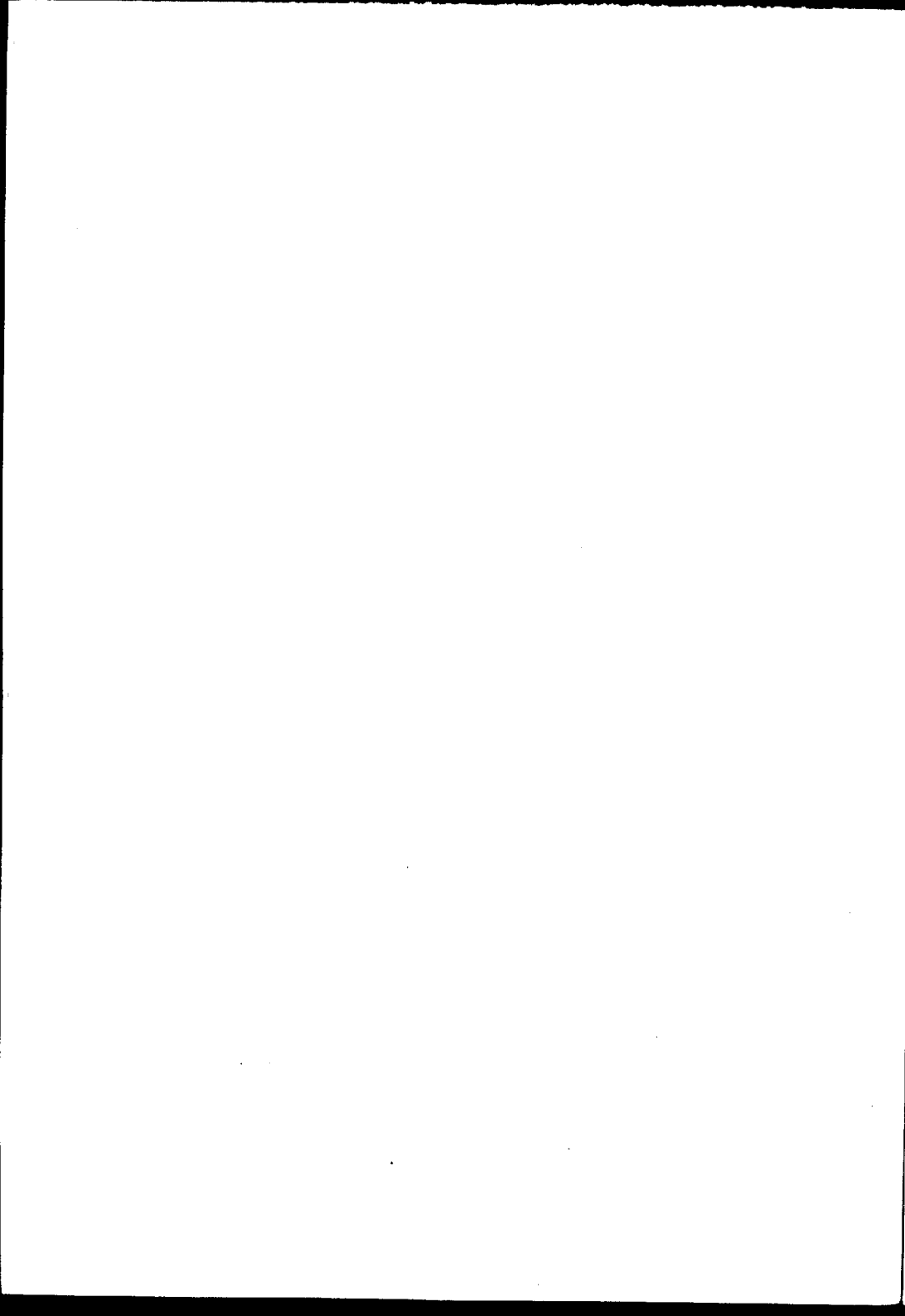
UTRECHT.

C. H. E. BREIJER.

1891



SACCHAROMYCES KEFYR.



# SACCHAROMYCES KEFYR.

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD

VAN

Doctor in de Geneeskunde

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

**D<sup>r</sup>. H. SNELLEN,**

*Hoogleraar in de Faculteit der Geneeskunde,*

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT,

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

op Vrijdag 2 October 1891, des namiddags te 4 ure,

DOOR

**JACOBUS HERMANUS SCHURMANS STEKHOVEN,**

GEBOREN TE HARDERWIJK.



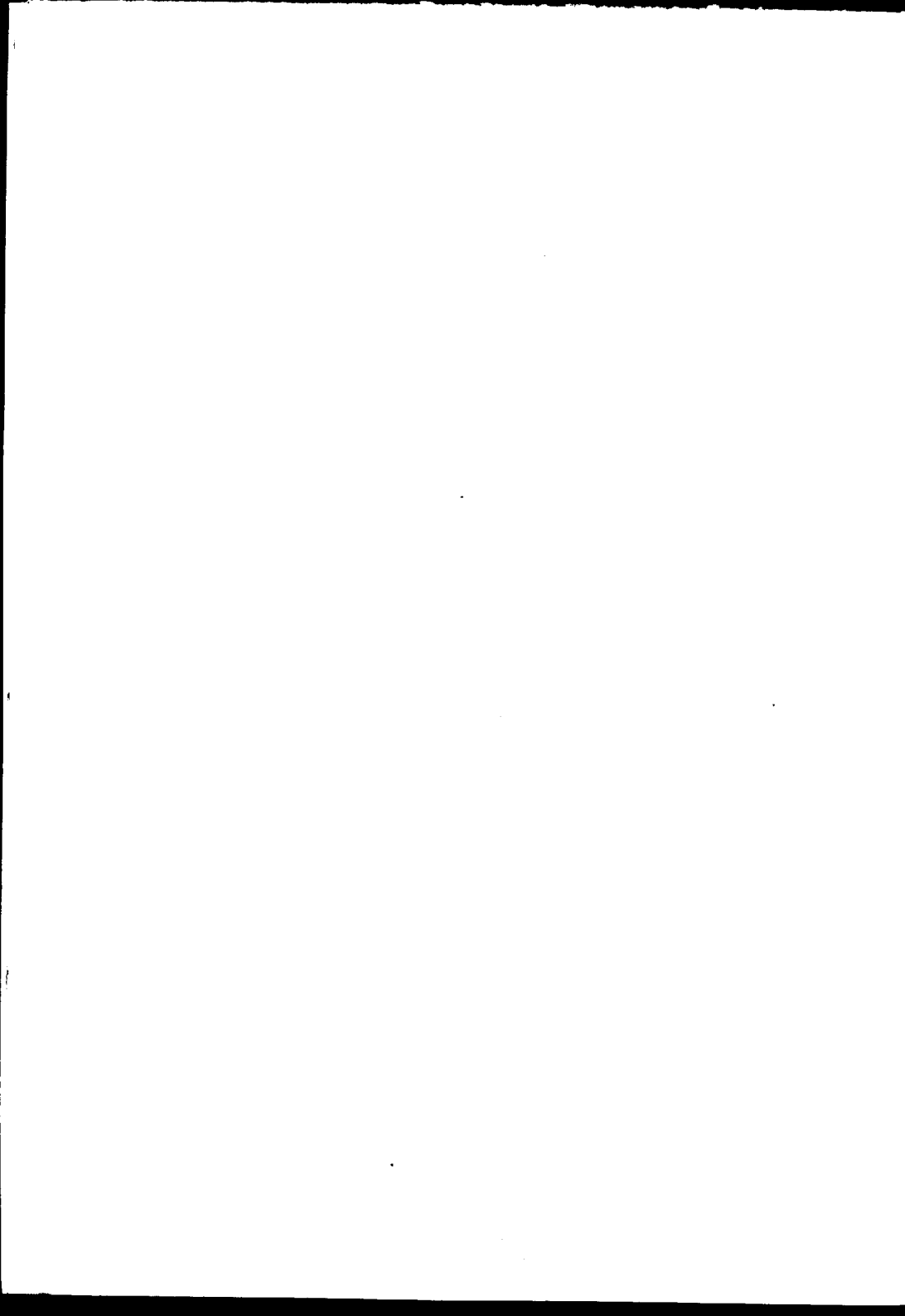
UTRECHT,

C. H. E. BREIJER.

1891

ZUID-HOLLANDSCHE BOEK- EN HANDELSDRUKKERIJ TE 'S-GRAVENHAGE.

*Aan mijn Vader.*



*U, Edelgrootachtbare Heeren, Curatoren der Rijks-  
universiteit te Utrecht, zij mijn dank gebracht voor den  
materieelen steun mij verleend.*

*Hoogleraren en Docenten der Utrechtsche geneeskundige  
faculteit, veel ben ik aan U verplicht; ik betuig U mijn  
dank voor Uwe lessen en de voorkomendheid, waarmee Gij  
mij steeds hebt bejegend.*

*Hooggeleerde ENGELMANN, dankbaar blijf ik U voor Uw  
onderwijs en Uwe steeds mij betoonde welwillendheid.*

*Zeergeleerde WINKLER, ik had het voorrecht U tot leer-  
meester te hebben bij mijne studie der psychiatrie; sta mij  
toe mij tot U te blijven wenden, zoo dikwijls ik Uw hulp  
behoef.*

*Den Hoogleraren en Docenten der Amsterdamsche genees-  
kundige faculteit ben ik erkentelijk voor de welwillendheid,  
waarmee zij hunne klinieken en laboratoria gedurende eenige  
maanden voor mij opengesteld hebben.*

*Zeergeleerde BEYERINCK, wees verzekerd van mijne dank-  
baarheid voor het materieel mij geschonken, voor de hulp  
mij verleend.*

*Meer in het bijzonder gevoel ik mij verplicht jegens U, hooggeachte Promotor, hooggeleerde PEKELHARING; ik had het voorrecht Uw assistent te zijn en onder Uwe leiding mijn proefschrift te mogen bewerken; steeds mocht ik mij verheugen in Uwe welwillendheid, Uw krachtigen steun bij en Uwe hartelijke belangstelling in mijne studie; ontvang voor dat alles mijn warmen dank.*

*Allen, die, op welke wijze ook, tot mijn vorming hebben bijgedragen en mijne studie hebben bevorderd, zij mijn dank betuigd.*

J. H. S. S.

Utrecht, Sept. 1891.

Een der meest kenmerkende eigenschappen der suikers is het vermogen om onder den invloed van bepaalde organismen in alcoholische gisting over te gaan. Wel is waar is slechts een beperkt aantal dier verbindingen, welke wij om hare scheikundige eigenschappen tot de koolhydraten rekenen moeten, hiertoe in staat, maar toch kunnen alle, hetzij door eenvoudige hydrolytische splitsing, hetzij door meer ingrijpende operaties, overgebracht worden in stoffen, die door biergist in alcohol en koolzuur gesplist kunnen worden. Hieruit volgt, dat het voor den scheikundige, die suikers onderzoekt, van het grootste belang is, de voorwaarden dier gisting, m. a. w. de biologische eigenschappen der gistcellen te kennen. Voor den bioloog bestaat hier een zeer gunstig arbeidsveld; wanneer men let op het feit door Fischer medegedeeld, dat onder de monosen slechts die voor gisting (door biergist) vatbaar zijn, wier aantal koolstofatomen drie of een veelvoud daarvan bedraagt, en bedenkt dat, dank zij den onderzoekingen van Fischer, de structuur van een aantal koolhydraten reeds vrij nauwkeurig bekend is, dan is men overtuigd, dat, zoo ergens, dan hier de voorwaar-

den voor de studie van de eigenschappen der levende stof uiterst gunstig zijn.

De bioloog heeft in afwachting van de resultaten der scheikundigen (bij hun onderzoek naar de structuur der suikers) de verhouding tusschen verschillende gistsoorten eenerzijds en koolhydraten en daarmee min of meer verwante verbindingen anderzijds te bestudeeren; daarmede kunnen dan de overige voedingsvoorwaarden der cellen nagegaan worden.

Hoewel reeds veel op dit terrein is geschied, zijn hier nog hoogst belangrijke resultaten te verkrijgen; men denke slechts aan het feit, eerst in de laatste jaren aan het licht gekomen, dat de melksuiker, die weerstand biedt aan de werking van biergist, wel degelijk voor alcoholische gisting vatbaar is. Van de gelegenheid, waarin ik verkeerde, om één dier gistsoorten, welke dit zoo stabiel koolhydraat in alcohol en koolzuur splitsen, eenigszins nauwkeurig te bestudeeren, maakte ik gretig gebruik. Na in het kort medegedeeld te hebben wat van melksuiker-splitsende gistcellen bekend is, zal ik mijne resultaten eenigszins uitvoerig mededeelen.

Het eerst werd door Duclaux <sup>1)</sup> uit melk, afkomstig van Lord-et-Cher, eene gist geïsoleerd, die het vermogen bezat om melksuiker alcoholische gisting te doen ondergaan. Deze gist was rond van vorm en klein van afmeting; in melk en in neutraal melkserum was de groei krachtig, de melksuiker werd daarbij snel en volledig in alcohol en koolzuur gesplitst. De gunstigste temperatuur voor de gisting bleek tusschen 25° en 32° C. gelegen te zijn; hoogere temperaturen

---

1) Annales de l'Institut Pasteur. T. I, p. 573.

waren, vooral wanneer de vloeistof zuur reageerde, schadelijk voor den groei. Melk werd wel is waar door de gist niet tot coagulatie gebracht, maar zij verloor toch de geschiktheid om, zonder te stremmen, gekookt te worden; reeds geringe hoeveelheden zuur bleken den groei te vertragen.

Aangaande de verhouding dier gist tegenover andere koolhydraten wordt door Duclaux medegedeeld, dat zoowel rietsuiker als laevulose en maltose gemakkelijk vergist worden, dat manniet en dextrine wel langzamerhand verbruikt worden, maar dat daarbij van alcoholvorming niets te bespeuren is.

Een andere gistsoort, in staat melksuiker te vergisten, werd door Adametz <sup>1)</sup> beschreven en met den naam van *Saccharomyces lactis* bestempeld. Aan deze beschrijving zij het volgende ontleend:

Terwijl de op pepton-gelatine gekweekte cellen bijna bolrond zijn en een middellijn van gemiddeld 7—8 mikron bezitten, is de vorm der cellen, die in moutaftreksel gegroeid zijn, meer eirond en elleptisch, en zijn er grootere verschillen in hare afmetingen waar te nemen; zelfs werden nu en dan langwerpige, worstvormige cellen gezien, welke bij een breedte van 5 mikron een lengte van 12 mikron bezaten. Van askosporenvorming werd niets waargenomen. De koloniën van *Saccharomyces lactis* hebben weinig karakteristieks; zij zijn rond, vlak en bezitten een bochtigen rand; zij zijn bij doorvallend licht donkerbruin gekleurd.

Steekculturen in pepton-gelatine, welke 1% glycerine bevat, bezitten een zeer karakteristiek voorkomen; terwijl op de oppervlakte, van de insteekplaats uit,

---

1) Centrabl. f. Bacteriologie. Bd. V, p. 6.

zich een dunne laag over de gelatine uitbreidt, heeft in het steekkanaal de groei in de eerste 10 dagen in den vorm van fijne witte korreltjes plaats; aan het einde der tweede week evenwel ontwikkelen zich bundels van fijne witte stralen, die naar alle richtingen in de gelatine indringen. Op en in mout-gelatine groeit *Saccharomyces lactis* uitstekend, ook hier is de stralenvorming zeer duidelijk <sup>1)</sup>. Wordt *Sacch. lactis* in steriele melk gebracht, dan is gedurende 3 of 4 dagen eene geringe gasontwikkeling waar te nemen; terwijl de melksuiker verbruikt wordt, blijft de caseïne onveranderd.

Deze mededeelingen van Adametz werden door Duclaux <sup>2)</sup> aan een strenge kritiek onderworpen. Duclaux is van meening, dat de verschillen, die volgens Adametz tusschen *Sacch. lactis* en de gist van Duclaux bestaan, niet van dien aard zijn, dat er veel waarde aan gehecht mag worden.

Duclaux wijst er op, dat Adametz, die zoo nauwkeurig den vorm der cellen en het voorkomen der koloniën heeft beschreven, verzuimd heeft quantitative suiker- en alcoholbepalingen te verrichten, dat hij dus niet in staat was te beoordeelen of de suiker geheel vergist dan wel voor een grooter of kleiner deel geoxydeerd werd. Bovendien is, volgens Duclaux, het kweeken op gelatine geen geschikt middel om verschillende gistsoorten van elkander te onderscheiden, en omgekeerd mag, volgens dezen onderzoeker, aan het overeenstemmen in voorkomen der

---

1) Volgens Adametz vertoont de gist van Duclaux wel eenzelfde groei op de oppervlakte der gelatine, maar is bij deze van stralenvorming niets waar te nemen.

2) Annales de l'Institut Pasteur. T. III.

gelatinekulturen niet veel waarde worden gehecht. Het aanwezig zijn van stralenbundels ter zijde van het steekkanaal acht Duclaux niet karakteristiek.

Een tweetal gistsoorten, beide in staat melksuiker te vergisten, werden door Dr. Beyerinck op het congres te Leiden (1889) besproken en in het Centralblatt für Bacteriologie, Bd. VI, beschreven. De eene, uit kefyrmelk verkregen, en daarom *Saccharomyces Kefyr* genoemd onderscheidt zich van *Saccharomyces cerevisiae* behalve door het vermogen om melksuiker te vergisten vooral daardoor, dat zij niet in staat is om maltose te vergisten, en bovendien door den vorm, de grootte en den inhoud der cellen.

De vorm, wel is waar inconstant, is in het algemeen beslist langwerpig; de grootte, eveneens zeer afwisselend, is gewoonlijk 5 tot 6 mikron, maar kan ook 20 en meer mikron bedragen, vooral in oude koloniën werden zulke groote cellen waargenomen; bovendien had in die koloniën de wand van een groot aantal cellen een donkere kleur gekregen, wellicht ten gevolge van uitputting van den voedingsbodem. De celkern was steeds duidelijk zichtbaar; askosporen werden niet waargenomen.

De andere gist verkreeg Dr. Beyerinck uit Edammer kaas; hij bestempelde haar daarom met den naam van *Saccharomyces Tyrocola*. De cellen, rond van vorm, zijn ongeveer drie tot vier mikron groot; de kernen zijn duidelijk zichtbaar en onregelmatig van gedaante; van askosporen werd niets waargenomen. Dr. Beyerinck acht het waarschijnlijk dat de Edammer-kaasgist dezelfde is als die, welke door Duclaux beschreven werd; *Saccharomyces Kefyr* zou identisch zijn met *Saccharomyces lactis* Adametz.

Dr. Beyerinck neemt aan, dat *Sacch. Kefyr* en *Sacch. Tyrocola* de melksuiker door een enzym inverteeren, alsvorens haar in alcoholische gisting over te brengen; dit melksuiker splitsend enzym bestempelde genoemde onderzoeker met den naam *lactase*.

### § 1. **Kefyrgist.**

In overleg met Dr. Beyerinck, die zoo welwiltend was kefyrgistkulturen te mijner beschikking te stellen, besloot ik deze gist aan een nader onderzoek te onderwerpen, waarbij ik mij vooral wilde toeleggen op de studie van het inverteerend enzym en van de voedingsvoorwaarden van dit organisme.

Terwijl Dr. Beyerinck vroeger, met goed succes, zich van eene biologische methode <sup>1)</sup> bediende, heb ik uitsluitend de methoden van scheikundig onderzoek gebezigd; wel is waar zijn deze niet zoo gevoelig, maar zij zijn, in verreweg de meeste gevallen gemakkelijker en zekerder, en bovendien hangt het resultaat niet in die mate van bijomstandigheden af, als dat bij de biologische methoden het geval is.

Mijne *waarnemingen* zijn, zooals blijken zal, volkomen in overeenstemming met die van Dr. Beyerinck; op een enkel, niet onbelangrijk punt, meen ik evenwel eene andere *verklaring* der waargenomen feiten te moeten aannemen als die, welke genoemde onderzoeker gekozen heeft. Het betreft n.l. de verklaring van het sterke lichten der lichtbacteriën in de omgeving van kefyrgist, welke op melksuiker bevattenden *Phosphorescens-grond* gekweekt wordt.

---

1) Dr. Beyerinck bediende zich van den z.g. *lichtenden grond*, ook *Phosphorencens-grond* genoemd. Zie hierover pag. 31.

Dr. Beyerinck neemt aan, dat dit lichten berust op eene inversie der melksuiker door het inverteerend enzym der kefyrgist; een andere verklaring van dit verschijnsel is door genoemden onderzoeker wel is waar niet gegeven, maar eenige opmerkingen, in zijne publicatie verspreid, kunnen als vingerwijzingen daarheen fungeeren. Van die aanwijzingen heb ik gebruik gemaakt, om tot eene verklaring van het genoemde verschijnsel te komen, toen het mij gebleken was, dat een inversie van de melksuiker door het inverteerend kefyrgistenzym inderdaad *niet* plaats vindt; een en ander wordt in de tweede paragraaf van deze verhandeling uitvoeriger besproken.

Alvorens de kefyrgistkulturen en de kefyrgistcellen te beschrijven, wil ik er op wijzen, dat reeds een tweetal onderzoekers tevergeefs getracht hebben uit kefyreene melksuiker vergistende gistsoort te isoleren; in de eerste plaats zij hier Duclaux genoemd; Duclaux isoleerde uit kefyreene gist, welke op melksuiker geenerlei werking oefende. Hij acht het daarom waarschijnlijk <sup>1)</sup>, dat in de uit melk bereide alcoholische dranken geen gisting der melksuiker als zoodanig heeft plaats gehad, maar dat de melksuiker vooraf geïnverteerd is door een zuur of door een enzym, afgescheiden door de in kefyreene tevens voorkomende fermenten. Die zuur- of enzymwerking beschouwt hij als niet zeer krachtig, omdat hij in kefyrmelk uit den handel steeds nog 1 à 2% melksuiker vond.

Inderdaad kon ook ik in kefyrmelk uit den handel de aanwezigheid van eene niet onbelangrijke hoeveelheid melksuiker aantoonen; ik bediende mij daartoe

---

1) Annales de l'Institut Pasteur. T. I, p. 574.

van het phenylhydrazine-reagens van Fischer. <sup>1)</sup>

De aanwezigheid van melksuiker bewijst evenwel slechts, dat de gisting dier suiker niet snel en niet volledig is geweest, en is evenzeer begrijpelijk bij eene directe vergisting door bepaalde gistcellen, als bij voorafgaande inversie door een zuur of een enzym, afkomstig van fermenten.

Behalve Duclaux heeft ook Cochin uit kefyrr een gistsort geïsoleerd, die melksuiker niet in alcohol en koolzuur vermocht te splitsen.

In de mij toegankelijke literatuur heb ik niets meer vermeld gevonden van pogingen om uit kefyrrkorrels een melksuiker vergistend mikroorganisme te isoleeren. Daar het niet op mijnen weg lag den bouw dier korrels en de eigenschappen der daarin voorkomende fermenten te bestudeeren, maak ik hier geen melding van de verschillende mikroskopische onderzoekingen der kefyrrkorrels.

Zooals ik reeds vermeldde, is de door mij onderzochte gist afkomstig van Dr. Beyerinck, die zoo vriendelijk was mij menigen nuttigen wenk te geven en wiens raad ik nimmer tevergeefs inwon, wanneer ik onverwachte moeilijkheden ondervond.

De kefyrgist kweekte ik op mout-pepton-druiven-suiker-gelatine, waarvan de samenstelling en de bereiding evenals die van alle andere voedingsstoffen in het aanhangsel <sup>2)</sup> vermeld wordt; dat ik in plaats van glucose geen lactose bezigde had hierin zijn grond, dat ik dezelfde gelatine wilde gebruiken voor het kweeken van biergist en dus genoodzaakt was een

---

1) Zie pag. 12.

2) Zie pag. 47.

koolhydraat te kiezen, dat door beide gistsoorten gemakkelijk geassimileerd wordt; ware dit niet het geval geweest dan zou zeker het gebruik van melksuiker de voorkeur verdiend hebben, omdat dit koolhydraat voor *Saccharomyces Kefyr* een zoo uitnemend voedsel is.

Van de inentingsstreep uitgaande breidt zich de gist met vrij groote snelheid over de gelatine uit; na een 10 tal dagen is, bij kamertemperatuur, de breedte van de kultuur een vijftal millimeter geworden.

Terwijl de biergist als helder-witte, onregelmatige klompen de gelatine bedekt, heeft een jonge kefyrgistkultuur min of meer het voorkomen van een paarlmoerachtig glinsterende laag, waarvan het oppervlak naar dat der gelatine schuins afloopt, een groot aantal fijne transversale groefjes bezit, en waarvan de rand fijn gekarteld is.

Bij de verdere ontwikkeling breidt zich de rand als een dunne laag over de gelatine uit, zoodat er een vrij scherpe tegenstelling ontstaat tusschen het centrale gedeelte der kultuur, dat een grijswitte kleur bezit en de peripherie, welke bij opvallend licht grijs gekleurd schijnt, en tevens behalve de fijne inkervingen, ook groote inhammen vertoont en daardoor een meer gelobd voorkomen verkrijgt.

Bij verderen groei verdwijnt die tegenstelling tusschen centrum en peripherie min of meer, de oppervlakte wordt dof, en tevens ziet men, wanneer de kultuur een drietal weken oud is, van verschillende punten van hare ondervlakte een aantal fijne stralen de gelatine binnendringen.

Deze *stralenbundels* zijn uit een kleiner of grooter aantal divergeerende stralen samengesteld; zij worden talrijker en grooter naarmate de kultuur ouder wordt,

zoodat eindelijk de ondervlakte der kultuur een fluweelachtig voorkomen verkrijgt; onderwijl droogt de gist min of meer uit en bedekt als een dun gerimpeld vliesje de gelatine.

Bij mikroskopisch onderzoek blijken de cellen ovaal van vorm te zijn en een groote neiging te bezitten om in de lengte uit te groeien. Terwijl in een gelatine-kultuur, welke 10 dagen oud is, het aantal lange cellen nog zeer gering heeten mag, neemt dit aantal spoedig toe, en ziet men in kulturen, die eenige weken oud zijn, geheele reeksen van langwerpige, worstvormige cellen, die twee of meer vacuolen bezitten, terwijl in de kleine, meer ovale vormen slechts één vacuole voorkomt.

Behalve kleine ovale en groote langwerpige cellen, ziet men ook groote ronde, die met den naam van reuzencellen bestempeld zouden kunnen worden. Hier en daar bevinden zich aan eene cel twee dochtercellen, hetzij beide aan één pool, hetzij aan iedere pool één. Kleuring met methyleenblauw, gentianaviolet en haematoxyline stelde mij niet in staat om aan de cel meer bijzonderheden waar te nemen.

Door gebruik te maken van joodjoodkalium verkrijgt men in vrij jonge kulturen, 1 tot 3 weken oud, bij een aantal cellen eene fraaie glycogeen-reactie, die echter bij oudere gistcellen niet of althans niet met zekerheid verkregen worden kan. De geheele cel is daarbij bruingekleurd, bruingekleurde korrels of massa's zijn niet te ontdekken zoodat aangenomen moet worden, dat het glycogeen door het geheele protoplasma verspreid is.

Bij het mikroskopisch onderzoek der stralenbundels blijken deze een groot aantal langwerpige gistcellen

te bevatten. Iedere stralenbundel kan het best vergeleken worden bij een boom, waarvan de takken uit aaneengeschakelde worstvormige cellen bestaan.

Om deze gemakkelijk zichtbaar te maken brengt men een schijfje der gelatine op een objectglas, en lost de gelatine op in sterk azijnzuur, dat de cellen vrij wel onveranderd laat.

De zwak zure mout-pepton-druivensuiker-gelatine wordt door de kefyrgist niet, althans niet duidelijk, tot smelting gebracht. De oppervlakte er van wordt wel een weinig verdiept, maar dat hierbij de verdamping een hoofdrol speelt is zeer waarschijnlijk. De vraag, of de gelatinedeeltjes door de binnendringende cellen der stralenbundels gepeptoniseerd en geassimileerd worden, dan wel eenvoudig ter zijde worden gedrukt, zal wel niet voor beantwoording vatbaar zijn; het feit dat die cellen in de stralenbundels nergens opeengehoopt zijn, maar slechts dunne en weinig divergeerende takken vormen, doet in de eerste plaats aan een terzijde dringen der gelatinedeeltjes denken.

Uit de hier gegeven beschrijving der kulturen van *Saccharomyces Kefyr* blijkt, dat Dr. Beyerinck niet ten onrechte deze gist voor identiek houdt met *Saccharomyces lactis* Adametz. <sup>1)</sup>

## § 2. Kefyrgistenzym.

De studie van het kefyrgistenzym trok mij vooral daarom aan, omdat ik meende, dat reeds een opper-

---

1) De veronderstelling van Dr. Beyerinck, dat de door hem beschreven *Sacch. Tyrocola* identiek is met de gist van Duclaux, kan niet juist zijn, omdat de gist van Duclaux maltose vergist, hetgeen *Sacch. Tyrocola* niet doet.

vlaakkig en onvolledig onderzoek van dit, zelfs melk-suiker invertierend enzym, belangrijke resultaten zou opleveren. In mijne verwachtingen zag ik mij evenwel teleurgesteld, zoodat ik mijn voornemen opgaf om, op gelijke wijze als Barth dit voor de biergistinvertine gedaan heeft, uit de keyfyrgist het enzym in zooveel mogelijk zuiveren toestand te isoleeren. Wegens de groote moeilijkheden, voor mij aan het kweeken van groote hoeveelheden keyfyrgist verbonden, heb ik voornamelijk het in de kultuurvloeistof gediffundeerde enzym bestudeerd, waarbij ik zorg droeg door controleproeven na te gaan of de overige bestanddeelen ook van invloed waren op het resultaat; tevens verzuimde ik niet keyfyrgistaftreksels te bezigen, die overigens dit onaangename hebben, dat zij sterk opaliseerend zijn zoodat het polarimetrisch onderzoek eenigszins bezwaarlijk gaat.

Om na te gaan of de melksuiker geïnverteerd was, heb ik mij in de meeste gevallen van het polarimetrisch onderzoek bediend; bij eenige oefening zijn de resultaten zeer nauwkeurig en doen ons tevens den graad der inversie kennen; tevens maakte ik gebruik van het phenylhydrazine-reagens <sup>1)</sup> om mij van het al of niet aanwezig zijn der inversieproducten te overtuigen; melksuiker, maltose en raffinose leveren n.l. met dit reagens resp. phenyllactosazon, -maltosazon en -raffinosisazon, welke in koud water moeilijk, doch in warm

---

1) Hieronder wordt verstaan een oplossing van zoutzure phenylhydrazine plus natriumacetaat in water. De volgende vloeistof werd door mij gebezigd: 10 gram zoutzure phenylhydrazine in de warmte opgelost in 50 c.c. eener natriumacetaatoplossing, welke in 100 c.c. 30 gram van dit zout bevatte.

water vrij gemakkelijk oplosbaar zijn, terwijl de osazonen van de inversieproducten dier suikers, phenylglucosazon en phenylgalactosazon zoowel in koud als in warm water moeilijk oplossen.

Wenscht men met behulp van phenylhydrazine na te gaan of inversie van rietsuiker heeft plaats gehad, dan mag men niet vergeten, dat rietsuiker bij langdurige verhitting met phenylhydrazine geïnverteerd wordt; deze inversie, door het reagens zelve, kan echter geen bron van fouten zijn, daar zij eerst plaats vindt wanneer de rietsuikeroplossing met het reagens gedurende ruim een half uur in het kokend waterbad verhit is; laevulose en glucose evenwel verbinden zich reeds zeer snel met phenylhydrazine, zoodat, wanneer deze koolhydraten aanwezig waren, reeds binnen 5 minuten na de plaatsing in het waterbad kristallen van phenylglucosazon zichtbaar worden; wanneer derhalve in het eerste half uur na de plaatsing van suikeroplossing plus reagens in het kokende waterbad geen kristallen gevormd zijn, dan kan men van de volkomene afwezigheid der inversieproducten van rietsuiker overtuigd zijn.

Melksuiker, maltose en raffinose worden bij verhitting met phenylhydrazine-reagens niet geïnverteerd, althans niet in de eerste twee uur; zoolang de mengsels van suikeroplossing en reagens in het kokende waterbad zich bevinden vormen zich dus geen kristallen, daar bovendien de osazonen dier suikers gemakkelijk in warm water oplosbaar zijn; bij bekoeling evenwel heeft met kleinere of grootere snelheid kristalafscheiding plaats.

Het onderzoek der vloeistoffen met behulp van phenylhydrazine vereischt minder tijd en minder materiaal dan het polarimetrisch onderzoek, is echter



minder nauwkeurig en niet tevens quantitatief.

Bij het onderzoek van vloeistoffen, vooral van gist-aftreksels naar de aanwezigheid van enzymen, dient men met volkomene zekerheid de werking van lagere organismen buiten te sluiten. Het door prof. Fokker en Salkowski aanbevolen chloroform scheen mij hiertoe het geschikteste middel te zijn. Alvorens van deze stof bij mijn onderzoek gebruik te maken, wilde ik er mij van overtuigen, dat het chloroform werkelijk in staat is om in zuivere riet- en melksuikeroplossingen, en in die, welke, gelijk de kultuurvloeistoffen en de gistaftreksels, peptonen en ander bacteriën-voedsel bevatten, de ontwikkeling en de werking van lagere organismen tegen te gaan, vooral omdat in het algemeen de temperatuur, waarbij de enzymen het krachtigst werken, dezelfde is als die, waarbij bacteriën het weligst groeien.

De volgende proeven werden dus door mij genomen. Een met chloroform verzadigde rietsuikeroplossing, welke in een 2 dm. lange buis het licht resp. 163', 162', 162' <sup>1)</sup> dus gemiddeld **162'** naar rechts draaide, plaatste ik in een waterbad van 35° C.

Na 38 uur werd, nadat de vloeistof weder tot kamertemperatuur was afgekoeld, op nieuw het draaiend vermogen bepaald; de grootte der draaiing was toen + 162', + 164', + 164', dus gem. + **163'**.

Een tweede proef gaf de volgende cijfers:

---

1) Bij de mededeeling mijner proeven meende ik niet te mogen volstaan met de opgave van de gemiddelde waarden, maar alle waargenomen en berekende cijfers te moeten vermelden, opdat de graad van nauwkeurigheid door een ieder beoordeeld zou kunnen worden.

draaiing aanvankelijk, + 170', + 173', + 172', dus  
gem. + **172'**;

plaatsing in een waterbad van 35° C.;

grootte der draaiing na 38 uur: + 170', + 168',  
+ 172', + 166', gem. + **169'**;

na 158 uur: + 168', + 170', + 170', + 170', gem.  
+ **170'**.

Een met chloroform verzadigde melksuikeroplossing,  
welke het licht **499'** (het gemiddelde uit 500', 504',  
496', 498', 498' en 500') naar rechts draaide, werd in  
een waterbad van 35° C. geplaatst.

Draaiing na 39 uur: + 514', + 506', + 510', + 506',  
+ 512', + 500', gem. + **508'**;

na 304 uur: + 510', + 506', + 508', + 508', + 508',  
gem. + **508'**.

Een met chloroform verzadigde, neutrale, pepton  
bevattende kandijsuikeroplossing, waarvan de draaiing  
aanvankelijk

+ 264', + 266', + 264', + 266', gem. + **265'** be-  
droeg, werd geplaatst in een waterbad van 32° C.;

draaiing na 17 uur: + 264', + 264', gem. + **264'**;

na 97 uur: + 270', + 270', + 264', + 264', gem.  
+ **267'**.

Na deze proeven, waarin op nieuw gebleken was,  
dat chloroform de ontwikkeling van inverteerende mi-  
kroben volkomen belet, kon ik overgaan tot proeven  
met *Saccharomyces Kefyr*.

#### Proef I.

In een aantal kookflesschen van Erlenmeyer, van  
500 c.c., ten deele met melksuiker-kandijsuiker-bouillon  
gevuld, (in elk 150 c.c.), bracht ik met een platinadraad

eene geringe hoeveelheid kefyrgist, welke gedurende 38 uur op mout-pepton-druivensuiker-gelatine gekweekt was. De hoeveelheid gist, welke in elk der flesschen was gebracht, scheen te klein te zijn geweest, zoodat ondanks krachtigen groei na 2 dagen de suiker niet geheel verbruikt was. Om na te gaan of in de kultuurvloeistof een enzym aanwezig was, verwijderde ik de nog aanwezige suiker door de kultuurvloeistof met chloroform te verzadigen, en daarna, in perkament-papieren buizen en in bedekte glazen, tegen chloroformwater te laten dialyseeren. De inhoud der dialysatoren bleek daarna suikervrij te zijn, en werd tot de volgende proeven gebezigd.

20 c.c. eener kandijsuikeroplossing werden met 20 c.c. der kultuurvloeistof vermengd; <sup>1)</sup>

draaiing, onmiddelijk na de vermenging: + 276', + 276', + 274', + 274', gem. + **275'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 18 uur: + 158', + 160', + 160', + 158', gem. + **159'**;

na 96 uur: — 124', — 123', gem. — **124'**.

De aanwezigheid van een invertierend enzym kon dus zeker geacht worden; door de dialyse waren aan de vloeistof de zure zouten onttrokken, zoodat de inversie slechts aan een invertierend enzym kon toegeschreven worden.

20 c.c. eener melksuikeroplossing werden met 20 c.c. der kultuurvloeistof vermengd;

---

1) In de proeven I tot VIII werden de suikeroplossingen en de vloeistoffen, waarin ik de aanwezigheid van een enzym wenschte aan te toonen, steeds met chloroform verzadigd gehouden.

draaiing, onmiddellijk na de vermenging: + 228',  
+ 228', + 230', + 228', gem. + **229'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 19 uur: + 232', + 233', + 228', + 230',  
gem. + **231'**;

na 96 uur: + 230', + 230', gem. + **230'**.

De melksuiker was dus niet geïnverteerd.

15 c.c. derzelfde melksuikeroplossing werden met  
25 c.c. kultuurvloeistof vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 150',  
+ 152', + 151', gem. + **151'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 97 uur: + 156', + 156', + 156', + 158',  
gem. + **157'**.

De geringe vermeerdering der draaiing ligt binnen  
de fouten der waarneming.

Om volkomen zekerheid te hebben, dat de waargenomen  
inversie van de rietsuiker door een enzym veroorzaakt was,  
kookte ik de kultuurvloeistof, en liet haar, na bekoeling,  
op rietsuiker werken.

20 c.c. rietsuikeroplossing werden met 20 c.c. der  
gekookte kultuurvloeistof vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 264',  
+ 266', + 264', + 266', gem. + **265'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 17 uur: + 264', + 264', gem. + **264'**;

na 97 uur: + 270', + 270', + 264', + 264', gem.  
+ **267'**.

De rietsuiker was volkomen onveranderd gebleven.

Het resultaat van deze proef verwonderde mij zeer

en bracht mij niet weinig in verlegenheid; van de verwachte min of meer volledige inversie van melksuiker was geen spoor te ontdekken. Daar ook de inversie der rietsuiker slechts langzaam geschiedde, bevatte de vloeistof blijkbaar weinig enzym, de inversie der melksuiker was misschien om die reden zoo gering, dat zij aan de waarneming ontsnapte.

### *Proef II.*

In een tweetal kookflesschen van Erlenmeyer, (in ieder bevond zich 150 c.c. melksuiker-kandijnsuikerbouillon), bracht ik kefyrgist, welke gedurende 17 uur in denzelfden bouillon gegroeid was. Krachtig zich ontwikkelende, jonge gistcellen in vrij aanzienlijke hoeveelheid werden dus voor deze proef gebezigd. De flesschen werden in een broedstof geplaatst, temperatuur 32° C. Na ongeveer 53 uur werden door decanteeren en filtreeren gist en kultuurvloeistof van elkander gescheiden, beide werden onderzocht ten einde het al of niet aanwezig zijn van een enzym vast te stellen.

*A. Onderzoek der kultuurvloeistof.* 1°. 25 c.c. kultuurvloeistof werden met 25 c.c. chloroformwater vermengd; draaiing onmiddellijk na de vermenging: — 31' <sup>1)</sup>, — 32', — 31', gem. — 31';

het mengsel werd geplaatst in een waterbad van 32° C.;

---

1) De in proef II vermelde cijfers dienen eigenlijk met 2,5 vermenigvuldigd te worden; van de gemengde vloeistoffen werden n.l. telkenmale 10 c.c. met 15 c.c. water verdund; deze verdunde oplossing werd polarimetrisch onderzocht, de daarbij afgelezen cijfers zijn hier genoteerd.

draaiing na 15 uur: — 30', — 28', — 30', — 30',  
gem. — **30'**.

2°. 25 c.c. kultuurvloeistof werden, na gekookt te zijn, met 25 c.c. chloroformwater vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: — 34', — 34',  
— 34', gem. — **34'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 14 uur: — 33', — 34', gem. — **34'**.

3°. 25 c.c. kandisuikeroplossing werden met 25 c.c. kultuurvloeistof vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 82', + 82',  
gem. + **82'**;

het mengsel werd geplaatst in een waterbad van 32° C.;

draaiing na 15 uur: + 20', + 22', + 22', + 20',  
gem. + **21'**.

Uit 1°, 2° en 3° is af te leiden, dat de kultuurvloeistof een invertierend enzym bevat, en tevens, dat een wellicht aanwezig tryptisch enzym noch het in de vloeistof aanwezige zuur kaliumphosfaat in staat zijn het linksdraaiend vermogen van het pepton te wijzigen.

4°. 25 c.c. kultuurvloeistof werden gekookt en na bekoeling met 25 c.c. melksuikeroplossing vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 80', + 80',  
gem. + **80'**;

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 13 uur: + 81', + 80', + 84', + 81',  
gem. + **82'**;

na 62 uur: + 86', + 83', + 79', + 77', gem. + **81'**.

Deze uitkomst bewijst, dat het zuur kaliumphosfaat, in de concentratie van 0,1 %, niet in staat is om, bij

eene temperatuur van 32° C. gedurende een tijdsverloop van 62 uur, melksuiker te invertieren.

5°. 25 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 25 c.c. melksuikeroplossing;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 76', + 76', + 74', gem. + 75';

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 27 uur: + 78', + 77', gem. + 78'.

6°. 25 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 25 c.c. melksuikeroplossing;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 78', + 76', + 76', + 76', gem. + 77';

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 15 uur: + 76', + 78', + 78', + 80', gem. + 78';

na 25 uur: + 78', + 76', + 77', + 78', gem. + 77';

na 62 uur: + 80', + 76', gem. + 78'.

In 5° en 6° was de melksuiker dus niet geïnverteerd.

Terwijl in de kultuurvloeistof de aanwezigheid van een rietsuiker invertierend enzym werd geconstateerd, was van eene splitsing der melksuiker niets te bespeuren.

*B. Onderzoek der gist.* De gist werd met ongeveer 25 c.c. chloroformwater, eerst gedurende 12 uur bij 32° C., en vervolgens gedurende 48 uur bij kamertemperatuur uitgetrokken.

25 c.c. gistaftreksel werden vermengd met 25 c.c. melksuikeroplossing;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 114';

het mengsel werd in een waterbad van 32° C. geplaatst;

draaiing na 5 uur: + 108', + 110', gem. + **109'**;  
 na 21 uur: + 112', + 112', + 108', gem. + **111'**;  
 na 48 uur: + 110', + 114', + 110', + 114', gem.  
 + **112'**.

Ook het gistaftreksel liet blijkbaar melksuiker on-  
 veranderd.

Daar noch in proef I, noch in proef II, van eene  
 splitsing der melksuiker iets te ontdekken was, achtte  
 ik het dringend noodig, alvorens uit mijne proeven  
 eenige conclusie te trekken, na te gaan hoe zich de  
 door mij gebezigde gist verhiel tegenover dextrose en  
 lactose; wanneer de gist werkelijk kefyrgist was,  
 moesten beide suikers in alcoholische gisting overge-  
 bracht worden. In dien tijd cultiveerde ik niet alleen  
 kefyrgist maar ook wijn-, bier- en kaasgist; de moge-  
 lijkheid bestond, dat ik mij bij het etiketteeren der  
 kultuurbuisjes had vergist, en dus met een der andere  
 gistsoorten had geëxperimenteerd. Voorzichtigheidshalve  
 ging ik nu op nieuw uit van de kultuur, door mij van  
 Dr. Beyerinck ontvangen.

### *Proef III.*

In een kookflesch van Erlenmeyer, van 500 c.c.,  
 bevattende 100 c.c. melksuiker-bouillon, bracht ik met  
 eenen platinadraad een weinig kefyrgist, gedurende  
 4 dagen op mout-pepton-druivensuiker-gelatine ge-  
 kweekt; de flesch werd in een waterbad van 32° C.  
 geplaatst. Na 64 uur werd de proef geëindigd, en de  
 kultuurvloeistof door decanteeren en filtreeren van de  
 gist gescheiden.

Het filtraat werd gedestilleerd, het destillaat woog  
 38 gram; soortelijk gewicht van het destillaat bij

15,5° C. 0,99751, bepaald met behulp van een picnometervan Sprengel; alkoholgehalte in gewichtsprocenten volgens tabel van Hehner: 1,36; hoeveelheid alkohol in het destillaat aanwezig: 0.517 gram.

Ongelukkig werd verzuimd te onderzoeken of de kultuurvloeistof nog reduceerde; waarschijnlijk was dit wel het geval, en was de suiker nog slechts ten deele verbruikt.

#### *Proef IV.*

In een kookflesch van Erlenmeyer, van 500 c.c., bevattende 100 c.c. dextrose-bouillon, bracht ik met een platinadraad een weinig kefyrgist, gedurende 4 dagen op mout-pepton-druivensuiker-gelatine gekweekt; de flesch werd in een waterbad van 32° C. geplaatst. Na 64 uur werd de proef geëindigd, en de kultuurvloeistof van de gist gescheiden. Het filtraat, dat Fehling's proefvocht nog sterk reduceerde, werd gedestilleerd;

het destillaat woog 29,322 gram;

soortelijk gewicht bij 15,5° C.: 0,99677;

alkoholgehalte in gewichtsprocenten: 1,83;

hoeveelheid alkohol: 0,537 gram.

Aanvankelijk veronderstelde ik, dat deze langzame vergisting het gevolg was van een te gering zuurghalte van den bouillon; het bleek mij evenwel, dat toevoeging van wijnsteenzuur den groei niet bevordert. Later kwam ik tot de overtuiging, dat ik te weinig gist had overgebracht en droeg ik zorg het gistquantum grooter te nemen door mij van een platinaoogje te bedienen; sedert dien tijd kreeg ik werkelijk betere resultaten.

*Proef V.*

In een kookflesch van Erlenmeyer, van 500 c.c., bevattende 150 c.c. melksuiker-bouillon, bracht ik een vrij aanzienlijke hoeveelheid kefyrgist, gedurende 6 dagen gegroeid op mout-pepton-druivensuiker-gelatine; de hoeveelheid melksuiker, in den bouillon aanwezig, werd nauwkeurig bepaald, zij bedroeg 4,376 gram (zie pag. 50).

De kookflesch werd geplaatst in een waterbad van 29° C. en 72 uur daarin gelaten; daarna werden gist en kultuurvloeistof afzonderlijk onderzocht.

De kultuurvloeistof reduceerde Febling's proefvocht niet meer, zij werd niet meer geel gekleurd bij koking met natronloog; ook door polarimetrisch onderzoek werd de volkomene afwezigheid van suiker geconstateerd; de vloeistof draaide n.l. het licht naar links en wel half zoo sterk als de bij de bereiding van den bouillon gebezigde peptonoplossing (zie pag. 50).

Van de kultuurvloeistof werd een derde, 50 c.c., gestedilleerd; het destillaat woog 17,5 gram;

soortelijk gewicht bij 15,5° C. : 0,99499;

alkoholgehalte in gewichtsprocenten : 2,84;

hoeveelheid alcohol in 50 c.c. kultuurvloeistof aanwezig: 0,497 gram; in 150 c.c. dus 1,491 gram.

Ofschoon de melksuiker geheel verbruikt was, was de hoeveelheid alcohol geringer, dan uit de melksuiker gevormd had kunnen zijn. <sup>1)</sup>

In de kultuurvloeistof werd tevens naar de aanwezigheid van een inverteerend enzym gezocht.

---

1) Uit 4,376 gram melksuiker had 2,235 gram alcohol gevormd kunnen worden.

1°. 25 c.c. kultuurvloeistof en 25 c.c. kandijnsuikeroplossing werden vermengd;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 252', + 254', + 254', + 254', gem. + **254'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 14 uur: — 108', — 106', — 108', gem. — **107'**.

Nog op andere wijze toonde ik aan, dat de rietsuiker werkelijk geïnverteerd was; in een reageerbuis vermengde ik 5 c.c. van de, het gepolariseerde licht linksdraaiende, vloeistof met 4 c.c. phenylhydrazine-reagens; vervolgens plaatste ik het buisje in het kokende waterbad; reeds na 5 minuten waren phenylglucosazonkristallen in grooten getale aanwezig.

2°. 50 c.c. der kultuurvloeistof vermengde ik met 50 c.c. melksuikeroplossing;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 260', + 260', + 260', gem. + **260'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 14 uur: + 260', + 260', + 262', + 260', gem. + **261'**.

Op dien tijd werd het mengsel ook met behulp van het phenylhydrazine-reagens onderzocht; bij 5 c.c. vloeistof voegde ik 4 c.c. reagens; het reageerbuisje bleef een uur in het kokende waterbad staan, kristallen vormden zich niet, alhoewel de vloeistof een bruin-gele kleur had gekregen. Toen het buisje eenige oogenblikken uit het waterbad genomen was, vormde zich een menigte kristallen van phenyllactosazon, welke bij verwarming wederom oplossen; van eene inversie der melksuiker was dus ook op deze wijze niets te bemerken.

Draaiing na 63 uur: + 258', + 262', + 260', + 260',  
gem. + **260'**;

na 111 uur: + 260', + 260', gem. + **260'**.

Ook de gist zelve werd aan een onderzoek onderworpen; zij werd gedurende bijna 3 dagen met chloroformwater uitgetrokken; dit aftreksel werd evenwel niet afzonderlijk onderzocht, maar vermengd met het gistaftreksel behoorende bij proef VI.

### *Proef VI.*

De inrichting van deze proef was gelijk aan die van proef V; het kweeken der gist duurde 92 uur. Zoowel in kultuurvloeistof als gist werd naar een enzym gezocht.

35 c.c. kultuurvloeistof werd met 35 c.c. melksuikeroplossing vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 134', + 134', gem. + **134'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 22 uur: + 134', + 134', gem. + **134'**;

draaiing na **49 dagen**: + 138', + 138', + 137',  
gem. + **138'**.

De gist werd gedurende 2 dagen met chloroformwater uitgetrokken, het gistaftreksel werd met dat van proef V vereenigd.

1°. 35 c.c. van de vereenigde gistaftreksels werden met 35 c.c. melksuikeroplossing vermengd;

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 260', + 260', + 258', + 260', gem. + **260'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 16 uur: + 256', + 260', + 260', + 260',  
gem. + **259'**;

na 41 uur: + 260', + 262', gem. + **261'**.

2°. 35 c.c. van de vereenigde gistaftreksels werden  
met 35 c.c. kandisuikeroplossing vermengd;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 288',  
+ 290', gem. + **289'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. ge-  
plaatst;

draaiing na **16 uur**: — 92', — 92', gem. — **92'**;

na 27 uur: — 94', — 92', gem. — **93'**.

*Terwijl de rietsuiker binnen 16 uur volledig geïnverteerd  
werd, was van een splitsing der melksuiker niets te be-  
merken.*

#### Proef VII.

In een kookflesch van Erlenmeyer, groot 500 c.c.,  
bevond zich 150 c.c. melksuiker-bouillon. In deze vloeis-  
stof, bevattende 4,376 gram melksuiker, werd gebracht  
eene vrij groote hoeveelheid gist, gedurende 6 dagen  
op mout-pepton-druivensuiker-gelatine gekweekt; de  
flesch werd geplaatst in een waterbad van 29° C. Na  
140 uur werd de gist van de kultuurvloeistof afgefil-  
treerd; beide werden afzonderlijk onderzocht. De kul-  
tuurvloeistof reduceerde Fehling's proefvocht niet meer.

40 c.c. der vloeistof werden gedestilleerd; gewicht  
van het destillaat: 28,183 gram;

soortelijk gewicht bij 15,5° C.: 0,99707;

alkoholgehalte in gewichtsprocenten: 1,64;

40 c.c. kultuurvloeistof bevatten dus 0,462 gram  
alkohol; in 150 c.c. was dus aanwezig 1,733 gram.

1°. 20 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 25 c.c. kandijsuikeroplossing:

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 308',  
+ 310', gem. + **309'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na **15 uur**: — 116', — 118', gem. — **117'**.

2°. 35 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 35 c.c. melksuikeroplossing;

draaiing onmiddelijk na de vermenging: + 212',  
+ 208', gem. + **210'**;

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 16 uur: + 206', + 210', gem. + **208'**;

na **49 dagen**: + 212', + 212', gem. + **212'**.

De gist werd gedurende 44 dagen met chloroform-water uitgetrokken; in het gistaftreksel werd slechts met behulp van phenylhydrazine naar de aanwezigheid van een invertierend enzym gezocht.

Een deel van het gistaftreksel vermengde ik met een gelijk volumen kandijsuikeroplossing; 5 c.c. van dat mengsel werden onmiddelijk met phenylhydrazine-reagens onderzocht; toen het reageerbuisje 45 minuten in het kokende waterbad had gestaan, werden de eerste kristallen zichtbaar; hieruit is met zekerheid af te leiden, dat in het gistaftreksel geen inversieproducten van rietsuiker aanwezig waren. 5 c.c. van bovengenoemd mengsel werden in een waterbad van 29° C. geplaatst en na 24 uur eveneens met phenylhydrazine onderzocht; 5 minuten na de plaatsing in het waterbad was het reageerbuisje reeds met eene kristalbrij gevuld.

Een ander gedeelte van het gistaftreksel vermengde ik met een gelijk volumen melksuikeroplossing; ook

hier werden 5 c.c. van het mengsel onmiddellijk met phenylhydrazine-reagens (4 c.c.) onderzocht; het reageerbuisje bleef een uur in het waterbad staan; kristallen vormden zich eerst, toen het buisje uit het waterbad verwijderd was. Het overige gedeelte van het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst; na 24 uur werd bij 5 c.c. daarvan 4 c.c. phenylhydrazine-reagens gevoegd; ook hier vormden zich eerst kristallen, toen het buisje, na een uur lang in het waterbad te hebben gestaan, daaruit verwijderd was. Na 4 dagen werd nogmaals 5 c.c. onderzocht, en hetzelfde resultaat verkregen.

In de volgende proef trachtte ik de voorwaarden voor de gisting gunstiger te maken door zorg te dragen, dat het quantum lucht, boven de vloeistof in de kookflesschen aanwezig, geringer was; dit geschiedde zoowel door het gebruik van kleiner kookflesschen als door vermeerdering van het volumen der vloeistof.

#### *Proef VIII.*

Twee kookflesschen, ruim 300 c.c. groot, bevatten ieder 200 c.c. melksuiker-bouillon. In beide werd gebracht eene vrij groote hoeveelheid gist, gedurende een 4 tal weken op mout-pepton-druivensuiker-gelatine gegroeid; de kookflesschen werden gedurende een drietal dagen in een waterbad van 29° C. geplaatst; cultuurvloeistof en gist werden beide onderzocht.

De cultuurvloeistof reduceerde Fehling's proefvocht niet meer; 1°. 50 c.c. er van werden gedestilleerd, gewicht van het destillaat: 33,578 gram; soortelijk gewicht bij 15,5° C.: 0,99707; alcoholgehalte in gewichtsprocenten: 1,64;

alkohol, in 50 c.c. kultuurvloeistof aanwezig: 0,551 gr.  
 2°. Nogmaals werden 50 c.c. gedestilleerd;  
 gewicht van het destillaat: 18,357 gram;  
 soortelijk gewicht bij 15,5° C.: 0,99454;  
 alcoholgehalte in gewichtsprocenten: 3,10;  
 hoeveelheid alcohol, in 50 c.c. kultuurvloeistof aanwezig: 0,569 gram.

Uit 2,917 gram melksuiker had zich dus gevormd 1,120 gram alcohol.

Beide destillaten gaven met natronloog en joodjoodkalium de jodoformreactie.

In de kultuurvloeistof werd met behulp van phenylhydrazine naar een invertierend enzym gezocht.

1°. 5 c.c. werden vermengd met 5 c.c. kandijsuikeroplossing: van het mengsel werden 5 c.c. onmiddellijk onderzocht, de overige c.c. gedurende 24 uur bij eene temperatuur van 29° C. gehouden. In de onmiddellijk onderzochte vloeistof ontstonden na toevoeging van 4 c.c. phenylhydrazine-reagens en plaatsing in een flink kokend waterbad, in de eerste drie kwartier uurs, geen kristallen; het restant der vloeistof, op gelijke wijze behandeld, veranderde reeds na 5 minuten in een kristalbruij; blijkbaar was hier de kandijsuiker vrij wel volledig geïnverteerd.

2°. 10 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 10 c.c. melksuikeroplossing; een deel van het mengsel werd onmiddellijk, een deel na 1 dag, een derde deel na 4 dagen met phenylhydrazine onderzocht; phenylglucosazon- en phenylgalactosazonkristallen vormden zich in geen dier proeven; de melksuiker was dus zeer zeker niet geïnverteerd.

De gist werd gedurende 4 dagen met ongeveer 40 c.c. chloroformwater uitgetrokken.

1°. 2,5 c.c. van het sterk opaliseerende gistaftreksel werden met 2,5 c.c. kandijsuikeroplossing vermengd; het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst en na 19 uur met phenylhydrazine onderzocht; 10 minuten na de plaatsing in het waterbad had zich reeds een kristalbrij gevormd.

2°. 5 c.c. van het gistaftreksel werden vermengd met 5 c.c. melksuikeroplossing en geplaatst in een waterbad van 29° C. Na 24 uur werd, met behulp van phenylhydrazine, de algeheele afwezigheid van glucose en galactose geconstateerd.

De krachtig werkende kultuurvloeistof gebruikte ik om na te gaan of het inverteerend enzym ook op maltose en op raffinose werkt.

1°. 10 c.c. werden vermengd met 10 c.c. maltoseoplossing ( $\pm 10\%$ ); deze 20 c.c. werden in 4 deelen *a*, *b*, *c* en *d*, ieder van 5 c.c., verdeeld; *a* werd onmiddellijk na de vermenging onderzocht, *b*, *c* en *d* werden in een waterbad van 29° C. geplaatst en resp. na 4, na 5 en na 6 dagen met phenylhydrazine onderzocht; *a* werd, na toevoeging van 4 c.c. phenylhydrazine-reagens gedurende 2 uur in het kokende waterbad verwarmd; geen kristallen waren toen zichtbaar, deze vormden zich zeer snel bij het afkoelen der vloeistof; *b*, *c* en *d* leverden hetzelfde resultaat.

*Maltose wordt dus door het kefyrgistenzym niet geïnverteerd.*

2°. 50 c.c. kultuurvloeistof werden vermengd met 50 c.c. raffinoseoplossing ( $\pm 8\%$ );

draaiing onmiddellijk na de vermenging: + 450', + 446', + 446', gem. + 447';

het mengsel werd in een waterbad van 29° C. geplaatst;

draaiing na 18 uur: + 404', + 402', + 402', gem.  
+ **403'**; <sup>1)</sup>

na 117 uur: + 258', + 254', gem. + **256'**.

*Raffinose wordt door het kefyrgistenzym geïnverteerd.*

Terwijl de hier beschreven proeven hebben aange-  
toond, dat het invertierend enzym der kefyrgist riet-  
suiker en raffinose splitst, maar melksuiker en maltose  
onveranderd laat, vindt men in de verhandeling van  
Dr. Beyerinck vermeld, dat ook de melksuiker door  
het kefyrgistenzym wordt geïnverteerd en bestempelde  
hij het daarom met den naam *lactase*. Daar genoemde  
onderzoeker op geheel andere wijze, als thans door  
mij geschied is, de kefyrgist aan een onderzoek heeft  
onderworpen, dient hier eenigszins uitvoerig de door  
hem gevolgde methode beschreven te worden.

Dr. Beyerinck bediende zich van den zoogenaam-  
den *lichtenden grond*, eene gelatinelaag, waarin een  
groot aantal individuen van *Photobacterium phosphorescens*  
gebracht zijn. Deze lichtbacterie behoort tot de pepton-  
koolstof-bacteriën (zie hierover pag. 36); zoowel voor  
den groei als voor het lichten vereischen deze bacteriën  
de gelijktijdige tegenwoordigheid van een peptonachtig  
lichaam, dat de noodige stikstof kan leveren, en van  
een tweede stof, die al of niet stikstofvrij kan wezen,  
als koolstof-bron.

Het experiment, op grond waarvan Dr. Beyerinck  
het bestaan van een melksuiker-splitsend enzym aan-  
neemt, vindt men o. a. beschreven in de Verslagen en

---

1) Gelijktijdig werd het mengsel met behulp van phenylhydrazine  
onderzocht; binnen 10 minuten na de plaatsing in het waterbad  
hadden zich kristallen gevormd, waarschijnlijk van phenylglucosazon.

Mededeelingen der koninklijke Akademie van Wetenschappen, afdeling Natuurkunde, deel VII, pag. 297.

Aan zeewater-pepton-gelatine voegde genoemde onderzoeker een overmaat van *Photobacterium phosphorescens* toe. Na korten tijd hield het lichten van de gelatine-laag op wegens gebrek aan assimileerbare koolstofverbindingen. Nu liet hij daarin diffusie-velden ontstaan van rietsuiker, raffinose en melksuiker, alle lichamen, welke niet door genoemde lichtbacteriën worden omgezet, en dus tot geen locale lichtverschijnselen aanleiding geven.

Hij trok vervolgens strepen van *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces Kefyr* en *Saccharomyces ellipsoideus* door de diffusie-velden der genoemde suikersoorten en deed na enkele dagen de volgende waarnemingen: rondom de strepen van *Saccharomyces Kefyr* werden in de diffusie-velden van alle drie genoemde suikers licht- en groei-velden van *Photobacterium phosphorescens* zichtbaar; rondom de strepen van *Saccharomyces cerevisiae* en *Saccharomyces ellipsoideus* geschiedde in het melksuiker-veld met *Ph. phosphorescens* niets bijzonders, de duistere toestand duurde voort, groei had niet plaats; in de diffusie-velden van rietsuiker en raffinose evenwel was groei en lichtontwikkeling waarneembaar.

Dr. Beyerinck verklaart deze waarnemingen op de volgende wijze. Hij neemt aan, dat het kefyrgist-enzym alle drie genoemde suikers invertteert, en dat dus in de diffusie-velden van *alle drie* genoemde suikers monosen vrij worden, welke tot den groei van *Photobacterium phosphorescens* aanleiding geven.

De invertine van de biergist en van de wijngist invertteert, zooals bekend is, slechts raffinose en riet-

suiker, en laat melksuiker onveranderd. Dr. Beyerinck meent, dat om die reden in het diffusie-veld van melksuiker, rondom de strepen van *Sacch. ellipsoideus* en *Sacch. cerevisiae* geen lichtontwikkeling plaats heeft.

Deze verklaring der verschijnselen schijnt mij moeilijk vol te houden, nu door mij is aangetoond, dat het keyfyrgistenzym melksuiker onveranderd laat, *niet* inverteert.

Wanneer wij nu de vraag stellen, of de genoemde waarnemingen niet verklaard kunnen worden op eene andere wijze, waarbij rekening gehouden wordt met het feit, dat het keyfyrgistenzym melksuiker *niet* splitst, dan moet het antwoord onmiddellijk bevestigend luiden.

Een zin, in de verhandeling van Dr. Beyerinck over de keyfykorrels <sup>1)</sup> bracht mij op den rechten weg bij het zoeken naar eene *verklaring* der zoeven beschreven waarnemingen. Op pag. 114 van die verhandeling leest men: „... ik nam waar, dat bij kulturen „ van mengsels van gistsoorten en melkzuurfermenten „ in geloselagen bij 37° C. de melkzuurfermentkoloniën, „ welke toevallig nabij gistcellen voorkomen, veel sneller „ groeien en grooter worden dan de daarvan ver- „ wijderd liggende. Het onderzoek leerde mij, dat hierbij „ de lactase, de *glycerine*, het barnsteen-zuur enz. zonder „ invloed zijn.”

Blijkbaar acht Dr. Beyerinck het, en zeker niet ten onrechte, waarschijnlijk dat de keyfyrgist, evenals de biergist, glycerine afscheidt; indien dit werkelijk het geval is, dan kunnen alle waarnemingen van Dr. Beyerinck op eenvoudige wijze verklaard worden.

1) Handelingen van het tweede Nederlandsche natuur- en geneeskundig Congres, gehouden te Leiden op den 26sten en 27sten April 1889.

Glycerine is, Udransky <sup>1)</sup> heeft dat aangetoond, een stofwisselingsprodukt der gist; de hoeveelheid glycerine, door de gist aan hare omgeving afgestaan, is derhalve des te grooter, naarmate de groei krachtiger is.

Die stof is bovendien een uitstekend voedsel voor *Photobacterium phosphorescens*, zij is het lichtvoedsel bij uitnemendheid. <sup>2)</sup>

Daar nu *Saccharomyces Kefyr* zoowel melksuiker als rietsuiker en raffinose assimileeren kan, is haar groei in de diffusie-velden dier suikers krachtig, het krachtigst in het melksuiker-veld, omdat dit koolhydraat een zoo uitnemend voedsel is voor deze gist.

*Saccharomyces Kefyr* geeft dus in de diffusie-velden dier suikers glycerine af, deze stof wordt door *Photobacterium phosphorescens* geassimileerd, groei en lichtvelden van deze bacterie worden zichtbaar.

*Saccharomyces cerevisiae* en *Saccharomyces ellipsoideus* assimileeren melksuiker niet; glycerine-afscheiding heeft niet plaats, de duistere toestand der plaat duurt voort, groei van *Ph. phosphorescens* wordt niet waargenomen.

Bovendien zullen natuurlijk in de diffusie-velden van rietsuiker en raffinose de monosen, welke daaruit door de invertierende enzymen van kefy-, bier- en wijngist ontstaan, tot lichtontwikkeling aanleiding geven. In het diffusie-veld van melksuiker is rondom de strepen van *Saccharomyces Kefyr* de lichtontwikkeling daarom niet minder sterk dan in de diffusie-velden der overige suikers, waar de inversieproducten tot *verhooging* der

---

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie. Bd. 13, p. 549.

2) Versl. en Mededeelingen d. Kon. Akad. v. Wetensch., Afd. Natuurk., Deel VII, pag. 246, 1890.

lichtkracht bijdragen, omdat de melksuiker zulk een uitstekend voedsel voor de kefyrgist is, en haar tot zeer sterke glycerine-afscheiding in staat stelt.

Slechts wanneer bij nader onderzoek de door mij hier gegeven verklaring onhoudbaar mocht blijken te zijn, mag aan de mogelijkheid gedacht worden, dat de door mij gekweekte en onderzochte gist, door welke omstandigheden dan ook, in hare biologische eigenschappen zoodanige wijzigingen heeft ondergaan, dat zij niet meer identiek heeten mag met de door Dr. Beyerinck beschreven en onderzochte *Saccharomyces Kefyr*, waarvan mijne kulturen afkomstig zijn.

### § 3. Experimenten ter bepaling van de voedingsvoorwaarden van *Saccharomyces Kefyr*.

De voedingsvoorwaarden van de kefyrgist heb ik onderzocht met behulp van de voortreffelijke, door Dr. Beyerinck aangegeven, auxanographische methode en met behulp van de telmethode. De auxanographische methode bestaat hierin, dat een groot aantal individuen van het te onderzoeken organisme in een gelatineoplossing worden verdeeld, waarna deze in een goed gesteriliseerde glazen doos wordt uitgegoten; na de stolling zijn dan de cellen gelijkmatig in de gelatine laag verspreid.

Daar handelsgelatine, zooals Dr. Beyerinck aantoonde, behalve een geringe hoeveelheid pepton, geen organische stikstof-vrije of stikstofhoudende bestanddeelen bevat, welke lagere organismen tot voedsel dienen kunnen, en daar bovendien de gelatine zelf voor de meeste mikroorganismen niet assimileerbaar

is, bevinden zich de individuen in eenen toestand van bijna volledige onthouding van voedsel. Wordt nu op die gelatinelaag een of andere stof gebracht, waarvan men wenscht te weten, of zij voor het te onderzoeken organisme als voedsel dienst kan doen, dan zal die stof met kleiner of grooter snelheid in de gelatinelaag diffundeeren, en ontstaan er cirkelvormige diffusievelden. Wordt de stof werkelijk door het mikroorganisme geassimileerd, dan zullen de individuen gaan groeien, zich vermeerderen en koloniën vormen; daar deze koloniën voor het bloote oog zichtbaar zijn, worden de diffusievelden dan geheel of gedeeltelijk tot groei-velden.

De meeste lagere organismen ontleenen de stikstof en de koolstof, welke zij voor den groei en de vermeerdering noodig hebben aan 2 verschillende verbindingen; deze organismen worden door Dr. Beyerinck met den naam *stikstof-koolstof-organismen* bestempeld. Voor de meeste organismen kan slechts *pepton* als *stikstof-bron* fungeeren (*pepton-koolstof-organismen*); door andere mikroben kan de stikstof aan amidën, ammoniakzouten of nitraten worden ontleend (*amid-, ammoniak-, nitraat-koolstof-organismen*).

Behalve van *pepton* enz. is voor de stikstof-koolstof-organismen de gelijktijdige tegenwoordigheid van een tweede stof, die al of niet stikstof-vrij kan wezen, als *koolstof-bron* een vereischte.

Tot die *pepton-koolstof-organismen* behoort *Photobacterium phosphorescens*, waarvan in de vorige paragraaf sprake was.

Bovendien zijn er nog *pepton-organismen*; deze vereischen voor hun algeheele voeding alleen *pepton-* of

eiwitachtige stoffen, welke zij door hunne krachtige proteolytische enzymen peptoniseeren; tot deze organismen behooren o. a. *Photobacterium luminosum* en *Photobacterium indicum*.

De auxanographische methode stelt ons in staat om met uiterst weinig moeite te bepalen tot welke groep een organisme behoort. Men heeft daartoe de mikroben te verdeelen in een gelatinelaag, welke, behalve de vereischte zouten, geen stikstof- of koolstof-voedsel bevat. Wordt nu op de oppervlakte der gelatinelaag pepton gebracht en ziet men een groeiveld ontstaan, dan weet men, dat pepton alleen voor de voeding voldoende is.

Ontstaat er geen groeiveld, zoo weet men, dat het onderzochte organisme niet tot de *pepton-organismen* behoort; dan dient nagegaan te worden welke stoffen als *koolstof-bron* dienst kunnen doen; men maakt nu gebruik van gelatine welke behalve de noodige zouten ook pepton bevat.

Nadat men in deze *pepton-gelatine* een vrij groot aantal mikroben verdeeld heeft, giet men haar uit in een glazen doos, en brengt daarna op hare oppervlakte die koolstof-verbindingen, welke men wenscht te onderzoeken; kan die verbinding voor het onderzochte organisme als koolstof-bron fungeeren, dan zal haar diffusie-veld een *groeiveld* worden.

Wenscht men te weten, of de mikroben behooren tot de pepton-koolstof-organismen of wel tot de amid-, ammoniak- of nitraat-koolstof-organismen, dan maakt men gebruik van gelatine, waaraan een koolstof-verbinding, welke door dat organisme geassimileerd wordt, is toegevoegd, en men laat in haar amiden enz. diffundeeren.

Deze gelatine-methode heeft verschillende groote voordeelen; vooreerst doet de concentratie van de gebezigde oplossingen weinig aan het resultaat af; is de concentratie op de plaats, waar de solutie op de gelatine gebracht is, te sterk en wordt daardoor de groei belemmerd, dan zal op eenigen afstand de concentratie de meest gunstige zijn, en ontstaat er een ringvormig groei-veld, terwijl dit in de meeste gevallen schijfvormig is; bovendien kan men op één plaat verschillende diffusie-velden zich laten vormen, en daar nu in dezelfde doos alle bacteriën onder dezelfde condities verkeeren, kunnen de resultaten vergeleken worden; tevens kost het experimenteren met deze methode weinig tijd en vereischt weinig oefening, zoodat een groot aantal resultaten in korten tijd te verkrijgen zijn.

Nadat mij gebleken was, dat *Saccharomyces Kefyr* tot de stikstof-koolstof-organismen behoort, bediende ik mij ter bestudeering van hare voedingsvoorwaarden achtereenvolgens van pepton-gelatine, asparagine-, riet-suiker-, glucose- en melksuiker-gelatine.

De oplossingen der stoffen, welke ik op de gelatine-laag wilde brengen, waren op de volgende wijze bereid: 50—200 milligram van de stof werd in een klein, gesteriliseerd reageerbuisje gebracht; 1 c.c. water werd daaraan toegevoegd, vervolgens werd het buisje met een watteprop gesloten en gedurende een half uur in den stoomtoestel van Koch gesteriliseerd. Deze gesteriliseerde oplossingen werden met steriele pipetten op de gelatine overgebracht. In de gelatine, bij ongeveer 35° C. gesmolten, werd een niet te geringe hoeveelheid gist verdeeld, waarna zij in een goed gesteriliseerde glazen doos werd uitgegoten; na een half uur werden de soluties op hare oppervlakte gebracht. In

de onderststaande tabel zijn achtereenvolgens vermeld de naam der gebezigde stof, de concentratie der oplossing, de ouderdom der gebruikte cellen (bij het begin der proef), het resultaat, waarbij + aanduidt dat er groei-velden zijn ontstaan en — dat het tegenovergestelde het geval is geweest, en de duur der proef.

Op pepton-gelatine werden gebracht:	procenten:	dagen:	resultaat:	dagen:
arabinose	10, 10, +)	4, 4,	—	3, 3.
arbutine	5, 5,	5, 5,	+	3, 3.
dextrine	5, 5,	5, 5,	—	6, 3.
galactose	20, 20,	3, 3,	+	4, 3.
glycerine	100, 100, 6, 6, 6,	3, 3, 5, 5, 8,	—	3, 4, 3, 2, 3.
glykogeën	5,	5,	—	6.
glucose	20, 20, 10,	3, 3, 4,	+	3, 3, 3.
inuline	10, 10, 5, 5, 5, 5,	4, 4, 5, 5, 8, 8,	+	3, 3, 3, 3, 3, 3.
maltose	20, 20,	3, 3,	—	3, 4.
manniet	5, 5,	5, 5,	—	6, 2.
melksuiker	20, 20, 10,	3, 3, 4,	+	3, 4, 3.
raffinose	20, 20,	3, 3,	+	4, 4.
rietsuiker	20, 20, 10,	3, 3, 4,	+	4, 4, 3.
appelzuur	5, 5,	5, 5,	+	6, 3.
barsteenzuur	5, 5, 5,	5, 8, 8,	+	6, 3, 3.
benzoezuur	5, 5, 5,	5, 8, 8,	—	6, 3, 3.
druivenzuur	5, 5, 5, 5,	5, 5, 8, 8,	—	3, 3, 3, 3.
glycerinezuur	6, 6, 5, 6,	5, 5, 8, 8,	—	3, 3, 3, 3.
kaneelzuur	5, 5, 5, 5,	5, 5, 8, 8,	—	6, 3, 3, 3.
melkzuur	6,	5,	+	3.
slijmzuur	5, 5,	5, 5,	—	6, 2.
wijnsteenzuur	5,	5,	—	3.
calciumlactaat	5,	5,	—	6.
neutrale wijnsteenzure				
natron	5, 5,	5, 8,	—	6, 3.
neutrale citroenzure				
natron	5, 5, 5, 5,	5, 5, 8, 8,	—	6, 6, 3, 3.
asparagine	1, 5,	4, 4,	—	3, 3.
Op rietsuiker-gelatine werden gebracht:				
asparagine	1, 1,	4, 4,	+	4, 3.
pepton Adamkiewicz	5, 5,	4, 4,	+	3, 3.

†) Om plaatsruimte te sparen zijn de cijfers, bij elke stof behorende, naast elkander gezet; het eerste cijfer van deze kolom behoort dus bij het eerste cijfer van de derde en van de vijfde kolom, enz.

	procenten:	dagen:	resultaat:	dagen:
<i>Op glucose-gelatine werden gebracht:</i>				
asparagine	5,	2,	+	3.
pepton Adamkiewicz	5,	2,	+	3.
<i>Op melksuiker-gelatine werden gebracht:</i>				
allantoïne	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.
alloxan	5, 5,	5, 5,	+	3, 3.
ammonium chloride	5, 5, 5, 5,	5, 5, 2, 2,	—	3, 3, 5, 5.
ammonium {	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.
nitraat {	5, 5,	2, 2,	+	5, 5.
ammonium sulfaat	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.
asparagine	5, 5, 1, 1,	5, 5, 2, 2,	+	3, 3, 5, 5.
glycocoll	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.
kreatine	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.
leucine	verzadigd,	5, 5,	+	3, 3.
tyrosine	verzadigd,	5, 5,	+	3, 3.
ureum	5, 5,	5, 5,	—	3, 3.

De telmethode, zooals deze door mij gebezigd is, bestaat hierin, dat een aantal organismen gebracht worden in een vloeistof, waarvan men wenscht te weten, of zij tot de voeding dier cellen dienen kan; zoowel onmiddellijk nadat dit geschied is, als eenigen tijd daarna onttrekt men aan de vloeistof, na deze goed geschud te hebben, eene geringe hoeveelheid, bijv. een platinaoogje vol, en brengt deze in vloeibaar gemaakte voedingsgelatine; de gelatine spreidt men dan over de binnenvlakte van het reageerbuisje uit [rolcultuur van Esmarch]; men telt nu na eenige dagen de koloniën, die uit de individuen zich ontwikkeld hebben. De resultaten van eenige, door mij op deze wijze verrichte proeven, bleken echter niet betrouwbaar te zijn, zoodat ik slechts ééne serie van deze experimenten heb genomen.

In een 10 tal reageerbuisjes bracht ik 5 c.c. vloeistof; in de onderstaande tabel vermeldt de eerste

kolom, wat benevens de zouten [0,1 %  $K H^2 P O^4$ , 0,02 %  $Mg S O^4$  en 0,01 %  $Ca Cl^2$ ] in iedere 5 c.c. aanwezig was; de tweede en de derde kolom wijzen aan hoeveel koloniën zich ontwikkelden in de rolkulturen, aangelegd 1°. onmiddellijk bij het begin der proef (tweede kolom), en 2°. nadat den gistcellen gedurende 24 uur gelegenheid gegeven was om de haar geboden stoffen te assimileeren en zich te vermeerderen. De hoeveelheid gist, welke in elk der buisjes gebracht werd, was uiterst gering.

n°. 1	48	46
n°. 2 asparagine 0,2 %,	31	19
n°. 3 rietsuiker 3 %,	38	31
n°. 4 glucose 3 %,	28	22
n°. 5 melksuiker 3 %,	52	27
n°. 6 asparagine 0,2 % + rietsuiker 3 %,	55	25
n°. 7 asparagine 0,2 % + glucose 3 %,	45	5
n°. 8 asparagine 0,2 % + melksuiker 3 %,	39	17
n°. 9 asparagine 0,1 %,	41	15
n°. 10 asparagine 0,1 % + rietsuiker 3 %,	46	27

Ten slotte verrichtte ik nog het volgende experiment: in een tiental kolfjes bracht ik 30 c.c. van eene asparagine-melksuiker-oplossing [asparagine 0,5%, melksuiker 5 %, zuurkaliumphosphaat 0,1 %, magnesiumsulfaat 0,02 % en calciumchloride 0,01 %]; aan den inhoud van 8 dier kolfjes, n°. 3—n°. 10, voegde ik een weinig pepton toe en wel zooveel, dat het peptongehalte der vloeistof in n°. 3 en n°. 4 **0.003** %, in n°. 5 en n°. 6 **0.01** %, in n°. 7 en n°. 8 **0.03** %, en in n°. 9 en n°. 10 **0.1** % bedroeg; n°. 1 en n°. 2 bevatten *geen* pepton; in elk dier kolfjes bracht ik een zeer kleine hoeveelheid gist, zoo weinig, dat van een troebelheid der vloeistof niet het minst te

bespeuren viel <sup>1)</sup>; daarna werden de kolfjes in een waterbad van 29° C. geplaatst; na 3 dagen was in n°. 1 en in n°. 2 een wel niet zeer krachtige, maar toch duidelijke groei waarneembaar, welke evenwel in de andere kolfjes veel sterker was, en wel des te sterker naarmate het pepton-gehalte grooter was.

#### § 4. De voedingsvoorwaarden van *Saccharomyces Kefyr*.

Een der belangrijkste vragen bij de studie van de voedingsvoorwaarden van een mikroorganisme is deze of voor groei en functie de aanwezigheid van pepton onmisbaar is. Onder pepton versta ik hier die stof, of juist gezegd dat mengsel van stoffen, dat, bij de digestie van eiwit door peptische of tryptische enzymen ontstaande, wel de eiwit-kleur-acties (acties van Millon, van Adamkiewicz, van Liebermann, de xanthoproteïne- en de biureet-actie), maar niet, althans niet bij verhitting de eiwit-precipitaat-acties (azijnzuur + keukenzout, azijnzuur + ferrocyaankalium enz.) geeft. Wel is waar doet de onzekerheid, waarin men omtrent de samenstelling van het pepton verkeert, ook haar invloed gelden bij die experimenten, in welke die stof een rol speelt, maar dit is toch niet in die mate het geval, dat alle proeven met pepton onvertrouwbaar en waardeloos moeten geacht worden; het schijnt, dat tusschen de verschillende peptonen, als mengsels beschouwd, meer quantitative dan kwalitative verschillen

1) Ik verdeelde daartoe een weinig gist in 5 c.c. gesteriliseerde keukenzoutoplossing van 0,6%, en bracht van dit mengsel met behulp van een platinaoogje een weinig in de kolfjes over.

bestaan, zoodat de hoofdeigenschappen van het eene pepton-praeparaat ook aan het andere worden teruggevonden.

Onder de, in de vorige paragraaf, beschreven proeven zijn er *drie*, die dienden om op de zoeven gestelde vraag een antwoord te verkrijgen. Vooreerst (zie pag. 40) liet ik asparagine diffundeeren in melksuiker-gelatine; daar de diffusie-velden steeds groei-velden werden, meende ik te mogen aannemen dat hier de asparagine als stikstof-bron had gefungeerd, en dat dus een mengsel van asparagine en melksuiker, waaraan de noodige zouten waren toegevoegd, al datgene bevat wat kefyrgist tot groei en vermeerdering noodig heeft. De tweede proef leverde een geheel ander resultaat (zie pag. 41); in eene asparagine-melksuiker-oplossing bracht ik kefyrgist, ik verwachtte met behulp van de telmethode eene vermeerdering der gistcellen te zullen constateeren, het omgekeerde was het geval; dit resultaat deed mij vermoeden, dat in de eerste proef het in de gelatine aanwezige pepton een belangrijke rol had gespeeld, en dat asparagine + melksuiker niet door *Saccharomyces Kefyr* geassimileerd kan worden, wanneer niet tevens pepton aanwezig is. De derde proef (zie pag. 41) leerde mij evenwel, dat deze veronderstelling onjuist was; in een geheel pepton-vrije vloeistof werd wel is waar langzame en geringe, maar toch duidelijke ontwikkeling waargenomen; tevens bleek mij, dat reeds een zeer gering pepton-gehalte (0.003 %) een enormen invloed heeft op de ontwikkeling; de toevoeging van minder dan 1 milligram pepton aan 30 c.c. asparagine-melksuikeroplossing maakte den groei veel sterker en krachtiger. Of hier het pepton de assimilatie der asparagine bevordert, of wel uitsluitend als gemakkelijk

assimileerbare stikstof-bron fungeert, heb ik niet nagegaan. Een antwoord op die vraag zou men kunnen verkrijgen door te bepalen, of de vermeerdering van het aantal cellen bij de aanwezigheid van verschillende hoeveelheden pepton evenredig is aan het pepton-gehalte.

Het resultaat der tweede proef zal moeten verklaard worden uit de eigenschap der keyrgistcellen om in kultuurvloeistoffen tot vlokjes zich te vereenigen, welke, zelfs bij sterk schudden, niet zoo gemakkelijk als meestal bij bacteriën het geval is, in afzonderlijke cellen uiteen vallen.

Dat het asparagine-gehalte tot op zekere hoogte van weinig invloed is, meen ik te mogen afleiden uit die experimenten, waarin ik melksuiker liet diffundeeren in asparagine-gelatine, waarvan het gehalte aan asparagine 0.1, 0.2, 0.3 en 0.4% bedroeg; in de uitgestrektheid en de ontwikkeling der groei-velden was geen verschil te bespeuren.

Bij de beoordeeling van experimenten ter bepaling van de voedingsvoorwaarden van lagere organismen, vooral van gistcellen, dient men steeds rekening te houden met het reserve-materiaal, dat alle jeugdige cellen bevatten, en dat deze in staat stelt om ook zonder toevoer van voedingsstoffen eenigermate te groeien en zich te vermeerderen. Niet alleen bevatten alle jeugdige gisteellen, ook *Saccharomyces Kefyr*, een vrij groote hoeveelheid koolstof-reserve-materiaal, glykogeen, maar bovendien moet ook een niet onbelangrijk deel van de in de cellen aanwezige stikstof als reserve-materiaal beschouwd worden, daar oude gisteellen nauwelijks een vierde van die hoeveelheid stikstof bezitten, welke het eigendom is van jonge individuen.

Door dit reserve-materiaal <sup>1)</sup> zijn de gistcellen eenigermate en gedurende korten tijd onafhankelijk van de samenstelling der vloeistof, welke als voedsel dienst moet doen. Dit zal in des te hoogere mate het geval zijn wanneer een groote hoeveelheid gist wordt overgebracht in een relatief geringe hoeveelheid vloeistof; van de gistcellen zal een niet klein aantal reserve-materiaal bevatten en dit, in de omgeving diffundeerende, zal de samenstelling der vloeistof zoo wijzigen, dat deze, zoo zij niet reeds geschikt voedsel bevatte, *alle* cellen in staat zal stellen om zich te ontwikkelen en te vermeerderen.

Met het oog op den storenden invloed van een groote hoeveelheid gist op het resultaat der proeven voegde ik aan de, op hare voedingswaarde te onderzoeken,

---

1) Waarschijnlijk is de reserve-stikstof hoofdzakelijk als pepton in de cellen aanwezig. Aan de gistcellen kunnen n.l. gemakkelijk peptonen onttrokken worden, zonder dat zulks steeds den dood der cellen ten gevolge heeft; dit was reeds aan Naegeli bekend (zie Die Theorie der Gärung, 1879).

Dat, althans onder sommige omstandigheden, ook uit de keyrgist peptonen diffundeeren, neemt Dr. Beyerinck aan, ter verklaring van het, door hem waargenomen feit, dat keyfrymelzuurfermenten, welke zich ontwikkelen in de nabijheid eener keyfrygistikolonie krachtiger groeien dan die, welke verder verwijderd zijn. Dr. Beyerinck neemt verder aan, dat bij die zeedieren, welke het z.g. bliksemlicht afgeven, *peptonen* gereed liggen om met de zuurstof in den georganiseerden toestand van levend protoplasma over te gaan, omdat bij de licht-bacteriën de licht-ontwikkeling met peptonverbruik gepaard gaat. De rustperioden, die vereischt worden om de ontwikkeling van «bliksemlicht» bij herhaling mogelijk te maken, zijn zeker niet alleen bestemd om de afscheidingsprodukten, die bij het bliksemlicht ontstaan, tijd te geven om weggevoerd te worden, maar ook noodzakelijk om den aanvoer en het ophoopen der reagerende peptonen mogelijk te maken.

vloeistoffen slechts een uiterst geringe hoeveelheid gist toe; een geringe vermeerdering, welke afhankelijk heeten mocht van het reserve-materiaal der gistcellen, zou niet waarneembaar geweest zijn; daar nu door mij in eene volkomen pepton-vrije asparagine-melksuiker-oplossing duidelijk vermeerdering der gistcellen werd waargenomen, moet aangenomen worden, dat asparagine ook dan, wanneer geen andere stikstof-houdende stof aanwezig is, als stikstof-bron voor *Saccharomyces Kefyr* fungeeren kan.

Een uitvoerige bespreking van de in § 3 medegedeelde tabellen acht ik geheel overbodig, slechts op een paar belangrijke punten wensch ik hier te wijzen. Gelijk reeds door Dr. Beyerinck is medegedeeld, kan *S. Kefyr* maltose niet assimileeren, een eigenschap, waardoor kefyrgist zich reeds dadelijk van de meeste andere gistsoorten onderscheidt; dat dit niet hierop berust, dat maltose door het kefyrgistenzym niet ge-inverteerd kan worden, behoeft nauwelijks herinnerd te worden, daar toch de biergist, wier inverteerend enzym eveneens maltose niet splitst, maltose als voedsel gebruiken en haar gemakkelijk vergisten kan; ook in mijne proeven bleek het, dat barnsteenzuur als voedsel voor *Saccharomyces Kefyr* dienst kan doen.

Of werkelijk *zuivere* inuline door de kefyrgist geassimileerd wordt, durf ik niet te beslissen; twee verschillende praeparaten, welke te mijner beschikking stonden, gaven beide op pepton-gelatine flink ontwikkelde groeivelden; ofschoon het mogelijk is, dat onzuiverheden, in beide praeparaten aanwezig, het groeien veroorzaakt hebben, acht ik dit niet waarschijnlijk, daar dan de groeivelden bezwaarlijk zoo goed ont-

wikkeld hadden kunnen zijn. De tijd ontbrak mij om den invloed van een groot aantal anorganische verbindingen, meer in het bijzonder van ammoniakzouten en nitraten, op den groei van de kefyrgist nauwkeurig te bestudeeren; daarom zijn slechts enkele hierop betrekking hebbende proeven, wier resultaat bovendien twijfelachtig is, in mijne tabellen vermeld.

### **Aanhangsel.**

De samenstelling der voedingsstoffen, ten deele afhankelijk van hare bereidingswijze, bepaalt de intensiteit van den groei en de mate van ontwikkeling der lagere organismen; daarom acht ik het gewenscht de bereiding der door mij gebezigde kultuurvloeistoffen en voedingsgelatine hier mede te deelen; te eer ga ik daartoe over, omdat ik bij de bewerking der gelatine in enkele, niet geheel ondergeschikte punten, van de algemeen daarbij gevolgde methode afweek.

*Mout-pepton-druivensuiker-gelatine.* Fijn gemalen en gezifte mout werd met ruim het dubbel gewicht water overgoten en gedurende 5 uur bij 55° C. gedigereerd; de vloeistof werd gedecanteerd, en de mout in een linnen doek uitgeperst; aan het troebele vocht voegde ik, wanneer ik uitgegaan was van 100 gram mout, een oplossing toe van 1 gram pepton van Kemmerich en 6 gram druivensuiker in 30 c.c. water, welke oplossing gedurende een half uur gekookt was om de in handelspepton dikwerf aanwezige sporen te doodden; dit mengsel verhitte ik gedurende een half uur in het apparaat van Koch om de eiwitstoffen van het moutextract te coaguleeren; na bekoeling kon eene vrij heldere vloeistof van eene geringe hoeveelheid bezinksel

afgeschonken worden; door toevoeging van water droeg ik zorg het volumen der vloeistof zoo groot te maken, dat het aantal c.c. het dubbele was van het aantal grammen mout, in casu dus 200 c.c.; in deze 200 c.c. werden nu gedurende een half uur of een kwartier 16 gram gelatine geweekt; dit mengsel plaatste ik in het apparaat van Koch gedurende 15 minuten, waardoor de gelatine oplost, en vervolgens, wederom gedurende 15 minuten in een waterbad van  $\pm 40^{\circ}$  C.; in dien tijd koelt de massa tot op ruim  $40^{\circ}$  C. af en kan men, ten einde de gelatine te klaren, eiwit toevoegen, zonder dat men voor onmiddellijke coagulatie bevreesd behoeft te zijn. De hoeveelheid eiwit koos ik zoo groot, dat er juist voldoende aanwezig was, om, bij de stolling, al de fijne, gesuspendeerde deeltjes in zich te sluiten; aan 200 c.c. gelatine-oplossing voegde ik toe 5 c.c. verdund kippeneiwit (het wit van één ei verdund met 20 c.c. water), deze hoeveelheid bleek mij de geschikste te zijn; wanneer ik de hoeveelheid eiwit kleiner nam was de coagulatie gebrekkig en bleef de gelatine troebel, bij toevoeging van een grooter hoeveelheid komt wel eene scheiding tusschen eiwit-coagula en heldere gelatine tot stand, maar de vlokken zijn minder geschrompeld, (tenzij men de gelatine langer verhit), waardoor de scheiding der heldere gelatine van de grootere en weekere coagula, door middel van filtratie, moeilijker plaats heeft. Na de toevoeging van het verdunde eiwit plaatste ik de gelatinemassa gedurende 35 minuten in het apparaat van Koch, en goot haar vervolgens op eenen, goed uitgekookten en vervolgens uitgewrongen, flanellen doek, welke bevestigd was op een vierkant houten raampje, dat rustte op een groot bekerglas. Het in de eerste secunden doorlopende

vocht goot ik onmiddelijk op het flanel terug en plaatste bekersglas met raampje enz. gedurende 15 minuten in den stroomenden waterdamp. De gefiltreerde, steeds volkomen heldere gelatine goot ik in reageerbuisjes, welke onmiddelijk na de vulling en bovendien in de eerste 3 of 4 dagen dagelijks éénmaal gedurende zeven minuten in den toestel van Koch werden verhit; na die verhitting werden de buisjes telkenmale in ijs-water overgebracht, ten einde de gelatine zoo spoedig mogelijk te doen stollen. Aldus bereide gelatine kan tot een temperatuur van 28° C. verwarmd worden zonder te smelten.

*Melksuiker-gelatine.* Fijne handelsgelatineplaten werden, nadat de randen verwijderd waren, in stukjes geknipt, en gedurende eenige uren eerst in waterleidingwater en vervolgens in gedestilleerd water geweekt. Door telkens het water te ververschen laten zich niet alleen de meeste fijne vezeltjes, welke aan de gelatine kleven, verwijderen, maar tevens wordt een niet onbelangrijk deel der eiwitstoffen en peptonen, welke de gelatine verontreinigen, daaraan onttrokken. Al laat zich door voortgezet macereeren aan de gelatine bijna al het pepton onttrekken, toch mag dit weeken niet al te lang duren, daar dan de gelatine zooveel water opneemt, dat na de verdere bewerking het gehalte der massa aan gelatine minder dan 6% zou bedragen.

Deze vermindering van het gelatine-gehalte heeft ten gevolge, dat de gelatine niet of nauwelijks vast blijft bij eene temperatuur, die 25° C. slechts weinig te boven gaat. De gezwollen gelatine werd vloeibaar gemaakt en hierbij werd zooveel water, melksuiker, kaliumphosfaat, magnesiumsulfaat en calciumchloride

gevoegd, dat het gehalte aan melksuiker enz. resp. 3%, 0,1%, 0,01% en 0,005% bedroeg. De met deze gelatine-massa ten deele gevulde reageerbuisjes plaatste ik gedurende een half uur in den stoomtoestel van Koch en daarna in ijswater.

*Glucose-gelatine, rietsuiker- en asparagine-gelatine.* Bereiding gelijk die van melksuiker-gelatine.

*Pepton-gelatine.* Pepton-gehalte 0,5%. De bereiding hiervan is bijna gelijk aan die van melksuiker-gelatine. Het pepton van Adamkiewicz overgoot ik met een oplossing der zouten; dit mengsel werd gekookt, gefiltreerd en vervolgens bij de gezwollen gelatine gevoegd.

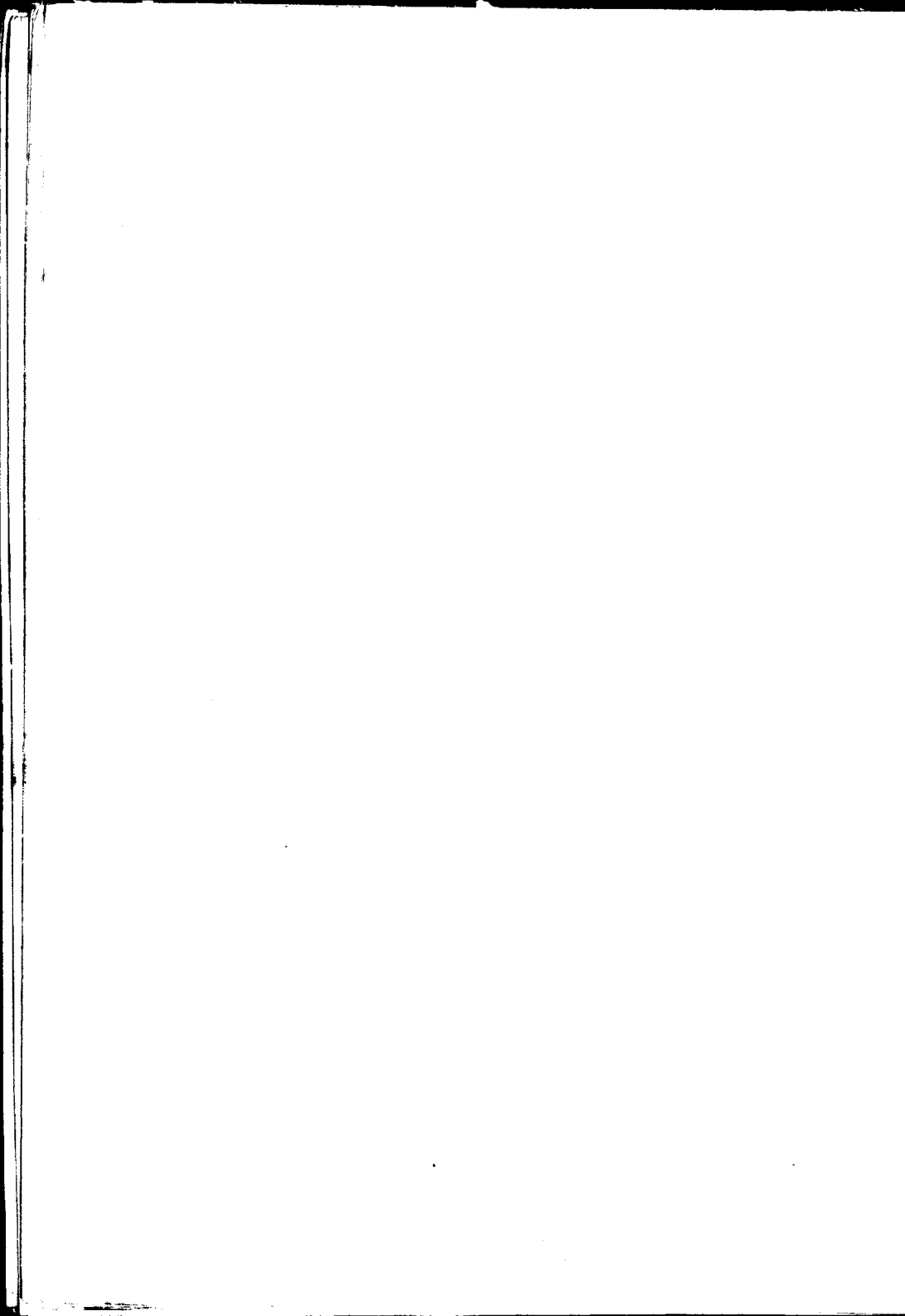
*Melksuiker-bouillon.* Samenstelling:  $\pm$  2% melksuiker, 0,5% pepton Kemmerich, 0,1% zuur kaliumphosphaat, 0,02% magnesiumsulfaat en 0,01% calciumchloride.

In de proeven V, VI, VII en VIII, geschiedde de bereiding van den bouillon en de nauwkeurige bepaling van het melksuiker-gehalte op de volgende wijze: 20 gram éénmaal omgekristalliseerde melksuiker werden opgelost in kokend water; na bekoeling werd het volumen der oplossing op 335 c.c. gebracht; deze melksuikeroplossing werd polarimetrisch onderzocht: rechtsdraaiing in 2 dM. buis 368'; het melksuikergehalte was dus 5,834%; 3 gram pepton werd opgelost in kokend water, na toevoeging der zouten werd de vloeistof een half uur gekookt, gefiltreerd en met water aangevuld tot een volumen van 300 c.c.; deze peptonoplossing draaide in 2 dM. buis het polarisatievlak 87 naar links; de 300 c.c. peptonoplossing werden vermengd met 300 c.c. melksuikeroplossing; het melksuikergehalte van dezen bouillon was dus 2,917%.

*Druivensuiker-bouillon.* Bereiding en samenstelling gelijk die van den melksuiker-bouillon.

*Melksuiker-kandijsuiker-bouillon.* Samenstelling: 2% melksuiker, 3% kandijsuiker, 2% pepton, 0,1% zuur kaliumphosfaat, 0,02% magnesiumsulfaat, 0,01% calciumchloride.

---



## STELLINGEN.

---

### I.

De protoplasma-uitloopers der gangliëncellen hechten zich ten deele vast aan de wanden der capillaria.

### II.

De sulci der hersenoppervlakte ontstaan door mechanische krachten, die van buiten op de grijze stof werken.

### III.

Er bestaat slechts één ademhalingscentrum, dat in de medulla oblongata gelegen is.

### IV.

Er is ondanks de proeven van Böhr geen reden om aan te nemen, dat in de longcapillaren de spanning van het koolzuur in het bloed grooter is dan in de arteria pulmonalis.

### V.

Ten onrechte beschouwt Heidenhain de capillair-endotheliumcellen als secernerende organen.

### VI.

De pathogene microben geven stoffen af, welke zich

met de stofwisselingsproducten der leucocyten en weefselcellen kunnen verbinden tot stoffen, die voor het organisme onschadelijk zijn en de schadelijke werking der bedoelde mikroben opheffen. Deze verbindingen blijven geruimen tijd in het bloed circuleeren en maken het organisme immuun.

## VII.

Dementia paralytica en tabes berusten steeds op syphilitische infectie.

## VIII.

Wanneer men bij de obductie het ruggemerg wenscht te onderzoeken, opene men het ruggemergskanaal aan de voorzijde.

## IX.

De bindweefselfibrillen ontwikkelen zich extracellulair.

## X.

Collageen ontstaat uit eiwit door oxydatie met opvolgende splitsing in een koolhydraat bevattende en in eene koolhydraat-vrije stof.

## XI.

Bij het onderzoek van urine op eiwit bediene men zich van de methode van Roberts.

## XII.

Ten onrechte houdt Araki (Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XV, H. 6) de suiker- en melkzuur-afscheiding na toediening van morphine, amylnitriet en cocaine voor het gevolg van respiratiestoornissen.

## XIII.

De toeneming der chloorafscheiding bij febris intermittens is het gevolg van het te gronde gaan van roode bloedlichaampjes.

## XIV.

Bij de chloroticae is niet de ijzerresorptie maar de ijzercirculatie gestoord.

## XV.

Het gebruik der maagsonde bij krankzinnigen, die voedsel weigeren, verdient geen aanbeveling.

## XVI.

Ataxie berust op eene laesie van die banen, welke van de sensibele eindapparaten leiden naar de motorische gangliëncellen van het ruggemerg en van de hersenschors.

## XVII.

Het vleesch van in geringe mate aan tuberculose lijdende runderen mag niet voor de consumptie ongeschikt verklaard worden.

## XVIII.

Het gebruik van koemelk als kindervoedsel verdient geen aanbeveling.

## XIX.

Wanneer men verdunde koemelk aan kinderen wenscht toe te dienen, gebruike men, bij de bereiding, nimmer rietsuiker maar steeds melksuiker.

## XX.

Bij oogheekkundige operaties gebruike men als anti-septicum steeds aqua chlorata.

## XXI.

Nystagmus berust op eene centrale parese der oogspieren.

## XXII.

De punctie der hersenventrikels bij hydrocephalus verdient geen aanbeveling.

## XXIII.

Het carbol worde uit de operatiekamer gebannen.

## XXIV.

Voor en gedurende een partus mag geen inwendig onderzoek geschieden, tenzij een abnormaal beloop verwacht wordt.

## XXV.

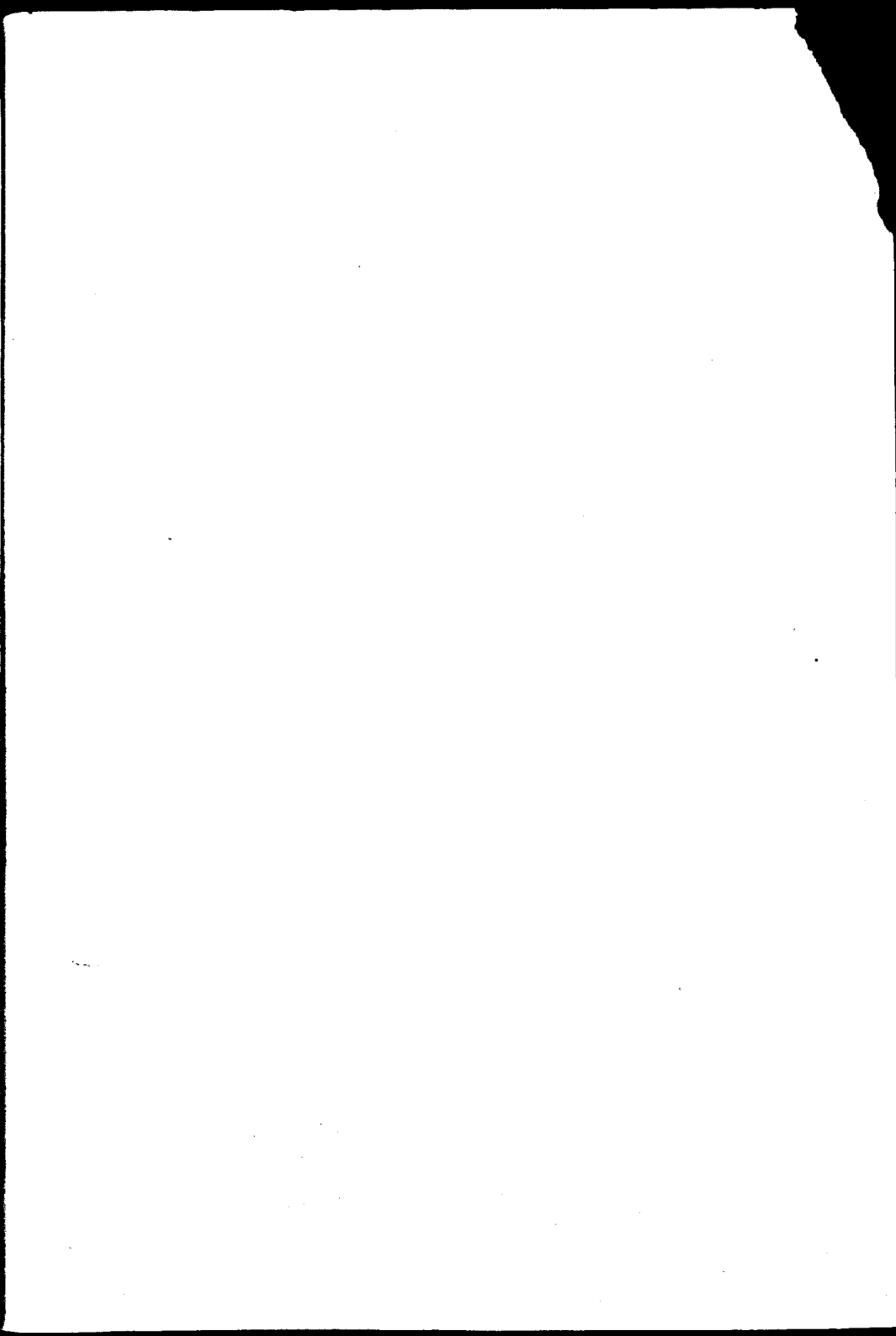
De methode van Sanger ter behandeling van enuresis (Archiv fur Gyn., Bd. 38, p. 324) verdient geen aanbeveling.

## XXVI.

Ten onrechte schrijft Lawson Tait aan de ovaria een geringen invloed toe op de menstruatie.

14987





21043