

RECENTE ONTWIKKELINGEN IN DE TECHNISCHE MICROBIOLOGIE

OPENBARE LES

GEGEVEN BIJ DE AANVAARDING VAN HET AMBT
VAN LECTOR IN DE TECHNISCHE MICROBIOLOGIE
AAN DE LANDBOUWHOGESCHOOL
OP 24 NOVEMBER 1960

DOOR

DR. H. VELDKAMP



H. VEENMAN & ZONEN N.V. — WAGENINGEN

*Mijne Heren Leden van het Bestuur van de
Landbouwhogeschool,
Dames en Heren Hoogleraren, Lectoren,
Docenten en Leden van de Wetenschappelijke
Staf,
Dames en Heren Studenten, en voorts Gij
allen, die door Uw aanwezigheid van Uw be-
langstelling blijkt hebt willen geven.*

Zeer geachte Toehoorders,

In zijn in 1922 gehouden inaugurele rede, getiteld „Microbiologie en Industrie”, voorspelde PROF. KLUYVER dat „gezien de duizenden micro-organismen, die nog slechts oppervlakkig zijn onderzocht en de niet te zeggen talrijke op onze aarde voorkomende organismen, die nog nimmer door den mensch zijn waargenomen, een rationele exploratie en exploitatie van de krachten der microbenwereld de menschheid nog vele zegenrijke uitkomsten zal kunnen brengen.”

Overzien wij de recente ontwikkelingen op het gebied der toegepaste microbiologie, dan blijkt in de eerste plaats hoe juist deze voorspelling was. In de tweede plaats zou men kunnen zeggen, dat deze zelfde woorden nog onverminderd van kracht zijn.

Het heeft na 1922 nog vrij lang geduurd eer een intensieve exploratie van nieuwe mogelijkheden een ware „boom” veroorzaakte op het terrein der technische microbiologie. In de dertiger jaren vond weliswaar een gestage ontwikkeling plaats in de exploitatie van micro-organismen, welke stoffen produceren zoals b.v. aethanol, butanol en aceton, doch de tijd was blijkbaar nog niet rijp voor spectaculaire ontwikkelingen. De door FLEMING gedane ontdekking bijvoorbeeld van een schimmel, die een stof produceerde, waarvan een zeer geringe hoeveelheid voldoende bleek om de groei van staphylococci te onderdrukken, trok aanvankelijk weinig belangstelling.

Het is nogal deprimerend te moeten vaststellen, dat juist oorlogsomstandigheden zo'n sterke prikkel vormen tot de ontwikkeling van mogelijkheden, welke voor onze samenleving van het grootste belang zijn. Het was onder de druk van deze omstandigheden, dat het gelukte in het tijdvak 1940—1943 de industriële productie van penicilline op gang te brengen. Daar het hier een microbiologisch proces betrof van een type, waarmee nog geen enkele industriële ervaring was verkregen, kon een dergelijke snelle ontwikkeling slechts tot stand gebracht worden dank zij een gigantische inspan-

ning van een groot aantal wetenschappelijke onderzoekers van zeer verschillende pluimage.

De kennismaking met de verbazingwekkende eigenschappen van penicilline, alsmede het feit, dat een aantal pathogene microben er ongevoelig voor waren, heeft tot gevolg gehad, dat een intensieve exploratie van de microbenwereld werd ingezet. Deze ontwikkeling werd verder nog in de hand gewerkt, doordat de snelle vooruitgang in de petroleumchemie een steeds grotere economische bedreiging vormde voor de microbiologische productie van stoffen zoals aethanol en butanol.

Zo vond en vindt in de microbiologische industrie een verschuiving plaats naar de productie van stoffen, welke door de organisch chemicus niet op economische wijze of zelfs in het geheel niet gesynthetiseerd kunnen worden.

Ten tijde van de totstandkoming van de penicillineproductie ontdekten WAKSMAN en medewerkers een actinomyceet, die een antibioticum vormde, dat werkzaam bleek tegen micro-organismen, die door penicilline niet beïnvloed werden. Met de industriële productie van dit antibioticum, dat streptomycine genoemd werd, kon reeds in 1946 een begin gemaakt worden.

De structuur van streptomycine bleek dermate ongewoon te zijn, dat PROF. KLUYVER in een in 1952 gehouden voordracht de opmerking maakte, dat een dergelijke structuur hoogstens opgekomen zou kunnen zijn in het brein van een organisch chemicus, die rijp was voor het krankzinnigengesticht. Dat deze chemicus ook nog vermoedens gehad zou kunnen hebben aangaande de biologische functie van dit product mag wel tot de onmogelijkheden gerekend worden.

Dergelijke overwegingen sterken de microbioloog bij het verder zoeken naar en bestuderen van stofwisselingsproducten van microben.

Na de tweede wereldoorlog zijn nog vele andere antibiotica ontdekt en het wordt steeds moeilijker om producten te vinden, die nog aantrekkelijker eigenschappen hebben dan de reeds bestaande. Dit betekent overigens niet, dat het zoeken naar nieuwe antibiotica tot stilstand gekomen is. Het blijkt namelijk, dat de toepassing van antibiotica een pijnlijk probleem geschapen heeft, te weten het optreden van sterk virulente staphylococcen, die resistent zijn tegen de gangbare antibiotica. Dit probleem is dermate ernstig, dat de huidige activiteiten in de antibiotica-industrie voor een groot deel gericht zijn op het vinden van een oplossing hiervoor. Het zoeken naar nieuwe antibiotica vindt dus gestadig voortgang, tot heil van de mensheid en van de industrie. Dat beider heil overigens niet altijd noodzakelijkerwijs samen hoeft te gaan, moge blijken uit het feit, dat de industrie er totnogtoe niet toe gekomen is een programma te ontwikkelen ter bestrijding van ziekten, welke zich voornamelijk

in de zgn. achtergebleven gebieden manifesteren, een en ander i.v.m. de zwakke economische positie van deze gebieden.

Het is inmiddels niet alleen op het gebied der antibiotica-productie, dat in en na de jongste oorlog grote successen geboekt zijn.

Zo maakt men b.v. in de zo belangrijke steroidchemie in de laatste jaren steeds meer gebruik van micro-organismen, welke op elegante wijze omzettingen kunnen verrichten, die de chemicus slechts op zeer gecompliceerde en daardoor kostbare wijze tot stand kan brengen.

Verder lijkt het niet onwaarschijnlijk dat land- en tuinbouw binnenkort zullen kunnen profiteren van de biochemische activiteiten van een schimmel, behorend tot het geslacht *Gibberella*. Industrieën in Amerika, Japan en Engeland maken sinds kort met behulp van deze schimmel het gibberellazuur alsmede enkele derivaten daarvan. Men is tot deze productie overgegaan, nadat gebleken was, dat deze stoffen uitgesproken effecten van uiteenlopende aard uitoefenen op de physiologie van hogere planten. Sinds 1958 weet men, dat gibberellazuur-achtige stoffen ook in de hogere plant zelf voorkomen en daar een groeistoffunctie hebben. Mogelijkheden tot toepassing in land- en tuinbouw worden thans zeer intensief onderzocht en het onderzoek opent naar het zich laat aanzien verschillende aantrekkelijke perspectieven. Zo bleek uit recente, in Amerika uitgevoerde experimenten, dat de katoenoogst met 20% verhoogd kon worden door juiste toepassing van het gibberellazuur en dat zowel het sapgehalte als het vitamine-C gehalte van sinaasappels er met $\pm 10\%$ door verhoogd kon worden.

Onderzoek op uitgebreide schaal is thans mogelijk dankzij de bewonderenswaardige biosynthetische vermogens van *Gibberella* soorten alsmede de bekwaamheid van de industriële teams, die kans zien om deze schimmels op de juiste wijze te kweken en vervolgens grote hoeveelheden cultuurvloeistof te ontdoen van geringe hoeveelheden gibberellazuur.

De technische microbiologie bevindt zich in een phase van snelle ontwikkeling en het zou niet moeilijk zijn genoemde voorbeelden met een aantal andere aan te vullen.

Doch liever dan hier een kaleidoscopisch beeld te geven van recente ontwikkelingen in de technische microbiologie zou ik mij willen beperken tot de bespreking van twee aspecten, welke op ons laboratorium speciale belangstelling hebben.

In de eerste plaats zou ik dan Uw aandacht willen vragen voor de aminozuurproductie door micro-organismen.

Bij de aminozuurproductie op grote schaal neemt glutaminezuur een belangrijke plaats in. Dit aminozuur wordt nl. in de vorm van het mono-natriumzout aan allerlei voedingsmiddelen toegevoegd als smaakverbeterend agens. Vooral in Japan en Amerika wordt dit

veelvuldig gedaan en men krijgt de indruk, dat glutaminezuur b.v. in Amerika ook wordt toegevoegd aan levensmiddelen, die deze smaakverbetering geenszins van node hebben, uitsluitend, omdat het opschrift „flavor added” op de verpakking van een voedingsmiddel een magische aantrekkingskracht uitoefent op de consument.

Om U een idee te geven van het verbruik in Amerika kan ik vermelden, dat dit in 1956 18 miljoen pond bedroeg, hetgeen voor een dergelijk product een respectabele hoeveelheid is. Naar een opgave uit 1959 neemt de vraag naar glutaminezuur over de gehele wereld genomen thans toe met 10—15% per jaar.

Men kan glutaminezuur langs chemische weg synthetiseren ofwel het isoleren uit melasse of uit eiwithydrolysaten, waarbij men uitgaat van plantaardige eiwitten zoals b.v. tarwe-eiwit.

Bij het zoeken naar andere wegen voor de verkrijging van glutaminezuur vond men een aanknopingspunt bij een microbiologisch proces, nl. bij de vorming van α -ketoglutaarzuur uit glucose door bacteriën.

Het was reeds lang bekend, dat dit zuur een sleutelpositie inneemt in de intermediaire stofwisseling zowel van eencellige als van hoger georganiseerde organismen. De ontdekking van STODOLA in 1946, dat een bacterie behorend tot het geslacht *Pseudomonas* in staat bleek bij de oxydatieve afbraak van 100 g. glucose niet minder dan 17 g. α -ketoglutaarzuur in het cultuurmedium af te scheiden, kwam dan ook min of meer als een verrassing.

Men heeft daarna vooral in Japan gezocht naar micro-organismen, die nog hogere opbrengsten opleveren. Succes is hierbij niet uitgebleven. Naar uit recente publicaties blijkt, beschikt men thans over een organisme, dat glucose voor 50—60% in α -ketoglutaarzuur kan omzetten.

De grote belangstelling voor de microbiële productie van α -ketoglutaarzuur vond onder meer zijn oorzaak in het feit, dat dit zuur chemisch nauw verwant is aan glutaminezuur.

De volgende stap was dus om een elegante manier te vinden om de omzetting van α -ketoglutaarzuur in glutaminezuur te realiseren. Men zocht en vond ook weer micro-organismen, die deze omzetting met bevredigende opbrengst wilden verrichten. Amerikaanse patenten uit de jaren 1956 en 1957 getuigen van het succes van deze speurtocht.

Men was dus nu in staat met behulp van twee verschillende bacteriën de omzetting van glucose in glutaminezuur in twee stappen tot stand te brengen.

Hiermee was echter de geschiedenis der microbiële productie van glutaminezuur nog niet ten einde. Veel begerenswaardiger zou natuurlijk nog zijn het micro-organisme, dat uit glucose direct zoveel glutaminezuur kon maken, dat men de industriële productie in één stap tot stand zou kunnen brengen. Men heeft daar dan ook

intensief naar gezocht; duizenden micro-organismen werden getest op hun vermogen tot glutaminezuurproductie, en de goudzoekers werden beloond.

Een Japanse onderzoeker, KINOSHITA, meldde in 1957 de isolatie van een bacterie, die dermate gunstige opbrengsten leverde, dat hiermee direct met de productie op commerciële schaal begonnen werd. In Amerika werd door Merck & Co licentie verkregen en men is daar in 1958 begonnen met de bouw van een fabriek van 4,5 miljoen dollar voor de productie van glutaminezuur met de in Japan geïsoleerde bacterie.

De gegevens welke ik U hier mededeelde zijn onder meer ontleend aan publicaties van STROBOLA en KINOSHITA en zij tonen aan hoeveel het er de industrie aan gelegen is „to be the quickest with the mostest” zoals men dat in de Angelsaksische landen wel schertsend noemt, en met hoeveel succes een dergelijk nobel streven bekroond kan worden als men maar het juiste micro-organisme tegenkomt.

Inmiddels heeft de isolatie van *Micrococcus glutamicus*, die thans in Japan en Amerika gebruikt wordt om glutaminezuur te produceren, belangrijke consequenties gehad. Zo is KINOSHITA er twee jaar geleden in geslaagd langs kunstmatige weg verschillende mutanten van dit organisme te verkrijgen, welke interessante eigenschappen vertonen. Een dezer mutanten bleek in staat om in een medium met glucose als koolstof bron het aminozuur lysine te kunnen produceren, en wel in hoeveelheden, die voldoende zijn om productie op commerciële schaal te beginnen.

Het onderzoek naar mogelijkheden om ook andere aminozuren met behulp van micro-organismen te produceren wordt intensief voortgezet en is ten dele reeds met succes bekroond.

Wat betreft de praktische betekenis van deze aminozuurproductie vermeldde ik U reeds het gebruik van glutaminezuur als smaakstof. Belangrijker is echter de toevoeging van aminozuren aan voedingsmiddelen ter verhoging van de voedingswaarde. Het blijkt nl., dat de eiwitten van bepaalde voedingsmiddelen arm kunnen zijn aan één of meer zgn. essentiële aminozuren. Men noemt een aminozuur essentieel voor een bepaald organisme, indien het dit aminozuur nodig heeft voor de opbouw van lichaamseiwit, terwijl het niet in staat is het betreffende aminozuur zelf te synthetiseren. Indien nu zo'n essentieel aminozuur in te geringe hoeveelheid aanwezig is in het eiwit van een voedingsmiddel, moet op een of andere wijze het tekort aangevuld worden. Dit kan geschieden door aan het voedingsmiddel eiwit toe te voegen, dat het betreffende aminozuur in grotere hoeveelheid bevat. Een andere mogelijkheid is, om het aminozuur, dat in het minimum is, als zodanig in de vereiste hoeveelheid toe te voegen.

Het blijkt nu, dat in het algemeen graanproducten eiwit bevat-

ten, dat arm is aan lysine. Dit is een aminozuur dat onder meer door zoogdieren in het geheel niet gesynthetiseerd kan worden. Zo zal dus door toevoeging van lysine aan b.v. tarwemeel de voedingswaarde hiervan verhoogd worden.

De ontdekking, of liever gezegd de creatie van een micro-organisme, dat vrij grote hoeveelheden lysine kan produceren uit simpele substraten moet dan ook als zeer welkom beschouwd worden.

Ik moge U er en passant nog op wijzen, dat de door micro-organismen geproduceerde aminozuren een aantrekkelijk voordeel vertonen ten opzichte van de door de chemicus gesynthetiseerde aminozuren. Daar met een enkele uitzondering alle aminozuren een asymmetrisch koolstof atoom bevatten, komen zij in twee vormen voor, de zgn. D- en L-vorm. Hiervan is slechts de L-vorm van biologische betekenis. De door microben geproduceerde aminozuren nu hebben uitsluitend de physiologisch belangrijke L-vorm, terwijl synthetisch bereide aminozuren altijd een mengsel van beide vormen bevatten.

De productie van aminozuren door micro-organismen heeft aspecten van biochemische en oecologische aard, welke een nadere studie ten volle waard zijn. Om deze reden zijn op ons laboratorium onlangs 300 uit grond geïsoleerde bacteriën behorende tot het geslacht *Arthrobacter* getest op hun vermogen om in simpele cultuurmedia aminozuren af te scheiden. Hieronder bevonden zich vier stammen, welke vrij aanzienlijke hoeveelheden aminozuren produceren. En hoewel het zeker geacht moet worden, dat geen industrie bereid zou zijn om ter wille van deze organismen een fabriek van 4,5 miljoen dollar te bouwen, voldoen ze toch wel degelijk aan de eisen, die voor eerder genoemd onderzoek gesteld moeten worden.

Het ligt inmiddels niet in mijn bedoeling U te vermoeien met details over onze werkzaamheden. Niet onvermeld zou ik echter willen laten, dat wij bij de bestudering van de omstandigheden, waaronder aminozuren afgescheiden worden gebruik maken van de techniek der continu cultivering. En dit brengt mij dan op het tweede aspect der technische microbiologie, waarover ik U wat uitvoerder zou willen spreken.

Er zijn gedurende de laatste twee jaar vijf symposia over het onderwerp der continu cultivering van micro-organismen gehouden, waarvan verschillende met internationaal karakter. Dit moge een bewijs zijn voor de grote belangstelling, die deze techniek op het ogenblik trekt.

Alvorens echter nader in te gaan op de continu cultivering, zou ik eerst een en ander willen mededelen over de klassieke discontinu cultuur, speciaal voor diegenen onder U voor wie het kweken van micro-organismen geen dagelijks werk is.

Men noemt een vloeistofculture van micro-organisme discontinu, indien tijdens het cultiveren geen vers medium aan de culture wordt

toegevoegd onder gelijktijdige afvoer van verbruikt medium.

In principe komt de werkwijze bij de discontinu cultuur hierop neer, dat men b.v. een reincultuur van een bacterie ent in een vloeibaar medium, dat geschikt is om het betreffende organisme tot ontwikkeling te brengen en dat vrij is van andere microben. Wanneer dan de temperatuur en andere condities zoals b.v. de zuurstofvoorziening gunstig zijn, zullen de cellen zich gaan vermenigvuldigen.

Het grafisch beeld van de relatie tussen de tijdsduur van cultiveren en het aantal bacteriën blijkt een S-vormige kromme te zijn. Dat wil zeggen wij kunnen de ontwikkeling van een bacteriecultuur grofweg in drie fasen verdelen: een beginphase, waarin het aantal organismen slechts uiterst langzaam toeneemt, een zgn. exponentiële phase, waarin een rechtlijnig verband bestaat tussen de logaritmie van het aantal bacteriën en de tijd en een eindphase, waarin aan de verdere ontwikkeling der cultuur vrij snel een eind komt. Dit laatste kan veroorzaakt worden, doordat één van de componenten van het medium volledig opgebruikt is ofwel doordat b.v. door zuurvorming het milieu dermate in ongunstige zin veranderd is, dat de groei tot stilstand komt.

Een van de meest karakteristieke aspecten van de discontinu cultuur is, dat vanaf het moment, dat het medium geënt is, er voortdurend veranderingen optreden. Dit geldt voor de samenstelling van het medium, zowel als voor de physiologische toestand van de cellen.

Een gevolg van de telkens wisselende physiologische toestand van het organisme is, dat de afscheiding van een bepaald stofwisselingsproduct in het medium veelal slechts maximaal is gedurende een onderdeel van de cultiveringsperiode.

Ter nadere illustratie zou ik U hiervan twee voorbeelden willen geven.

Uit ons eigen onderzoek over de aminozuurafscheiding van een *Arthrobacter*-stam bleek, dat gedurende de beginphase van de groei een aanzienlijke hoeveelheid alanine wordt afgescheiden, terwijl pas in een later stadium glutaminezuur geproduceerd wordt.

Een gecompliceerde opeenvolging van processen zien we bij de vergisting van koolhydraten door de boterzuurbacterie *Clostridium acetobutylicum*. Tijdens de phase der exponentiële groei worden aanzienlijke hoeveelheden boterzuur en azijnzuur gevormd. De hierdoor veroorzaakte verzuring van het medium bewerkstelligt enerzijds, dat de groei van de bacteriën tot stilstand komt en anderzijds, dat de physiologische toestand der cellen dusdanig verandert, dat er een verschuiving plaats vindt van zuurproductie naar de vorming van neutrale gistingproducten. De aanvankelijke afgescheiden producten, boterzuur en azijnzuur worden in dit stadium weer door de cellen opgenomen en dienen resp. als uitgangspunt voor de vorming van butanol en aceton.

Samenvattend kunnen we dus zeggen, dat de klassieke wijze van

cultiveren van welk micro-organisme dan ook resulteert in een successie van veranderingen zowel in het milieu als in het stofwisselingsapparaat van het organisme.

Voor doeleinden van uiteenlopende aard zou het zeer aantrekkelijk zijn, indien de mogelijkheid bestond om een micro-organisme gedurende zeer vele generaties in een gewenste physiologische toestand te houden. Uit het volgende moge blijken, dat dit gerealiseerd kan worden met behulp van de techniek der continu cultivering.

Het principe van de continu cultuur kan aan het volgende eenvoudige voorbeeld geïllustreerd worden. Gesteld, dat men een bacterie kweekt in een medium met glucose als energiebron en dat alle stoffen voor de groei benodigd in overmaat aanwezig zijn met uitzondering van glucose, waarvan slechts een beperkte hoeveelheid voorradig is. De groei in dit medium zal tot stilstand komen zodra alle glucose verbruikt is. Indien we er vervolgens toe overgaan om met constante snelheid steriel glucosehoudend medium aan de cultuurvloeistof toe te voegen en gelijktijdig zorgen voor een even snelle afvoer van verbruikt, celmateriaal bevattend medium, dan hebben wij een continu cultuur in zijn eenvoudigste vorm gecreëerd. Door het continu toevoegen van het groeibeperkende substraat, glucose, zijn de bacteriën in staat zich te blijven vermenigvuldigen. Het volume van de culture blijft constant, daar de snelheid waarmee verbruikt medium uit het cultuurvat wordt afgevoerd gelijk is aan de toevoersnelheid van vers medium.

Voor het goed functioneren van een dergelijke cultuur is een goede menging van het vers ingevoerde medium met de cultuurvloeistof natuurlijk essentieel.

Het effect van de toevoeging van vers medium is afhankelijk van de verhouding, welke bestaat tussen de snelheid van toevoer en het vloeistofvolume van de cultuur. Het is b.v. duidelijk, dat langzame toevoeging van vers medium aan een groot volume cultuurvloeistof, van betrekkelijk geringe invloed is op de groeisnelheid van de cellen.

Hoewel op het eerste gezicht de aangebrachte wijziging in cultiveringstechniek weinig schokkend mag lijken, is hiermee toch een situatie geschapen, welke diepgaande verschillen vertoont met de klassieke discontinu cultuur.

Het bijzondere van de continu culture is namelijk, dat deze de eigenschap heeft zich op een bepaalde evenwichtstoestand in te stellen; d.w.z. bij een gefixeerde toevoersnelheid van medium ontstaat er in de cultuur een toestand, waarin factoren zoals de chemische samenstelling van de cultuurvloeistof, het aantal micro-organismen, alsmede de groeisnelheid en de physiologische toestand van de cellen, constant zijn en blijven. De hele karakteristiek van zo'n evenwichtstoestand wordt uitsluitend bepaald door de toevoersnelheid van vers medium en de concentratie van het daarin aanwezige groeibeperkende substraat.

Verbreken we nu de evenwichtstoestand door b.v. de toevoersnelheid te vergroten, dan neemt de concentratie van het groeibepurende substraat in de culture toe, waardoor de groeisnelheid van de bacteriën ook verhoogd wordt en zich een nieuw evenwicht instelt.

Bij steeds verdere verhoging van de toevoersnelheid van vers medium stuit men echter op een situatie, waarbij de maximale groeisnelheid van de bacteriën overschreden wordt, en dit resulteert dan onvermijdelijk in een volledig wegspoelen van de bacteriën uit het cultuurvat. Indien men echter deze maximale toevoersnelheid niet overschrijdt, kan een willekeurig groot aantal evenwichtstoestanden gerealiseerd worden. Bij elke evenwichtstoestand behoort een bepaalde constante groeisnelheid van het organisme en dit houdt in dat men dus thans in staat is allerlei zich in de cel afspelende biochemische processen te bestuderen in afhankelijkheid van de groeisnelheid.

De toepassing van de techniek der continu cultivering is eigenlijk eerst goed tot ontplooiing gekomen, nadat in 1950 gelijktijdig door MONOD in Frankrijk en NOVICK en SZILARD in Amerika de theoretische grondslagen gelegd werden, welke later onder meer door HERBERT in Engeland verder uitgewerkt zijn. Eerst hierdoor is duidelijk geworden waardoor de toevoersnelheid van vers medium bepalend is voor de groeisnelheid van de culture. Men kan nu zelfs op grond van theoretische overwegingen voor elke willekeurige evenwichtstoestand voorspellen, hoeveel cellen per tijdseenheid het cultuurvat verlaten en hoe groot de concentratie is van onverbruikt substraat dat verloren gaat. Een dergelijke mogelijkheid is onder meer van groot belang voor de practicus, die er op uit is een proces zo economisch mogelijk te doen verlopen.

Men heeft in de laatste jaren deze voorspellingen aan de practijk getoetst en het is gebleken, dat althans in kwalitatief opzicht de verzamelde gegevens verrassend goed voldoen aan de verwachtingen. Daar men bij de berekeningen enkele experimenteel vast te stellen groeiconstanten moet invoeren, en deze constanten, zoals van levend materiaal te verwachten is, niet zo constant zijn als een mathematicus wel zou wensen, wijken de voorspellingen in quantitatief opzicht nog wel eens af van de waarneming.

Het lijkt echter geen twijfel dat de in 1950 gelegde theoretische basis van grote betekenis is geweest voor de toepassing van de techniek der continu cultivering en dat voor de ontwikkeling van meer gecompliceerde varianten van de hier geschetste continu culture een voorafgaande theoretische analyse onmisbaar is.

Ik moge U er en passant op wijzen, dat er een principieel verschil bestaat tussen de hier besproken continu cultivering van micro-organismen en het kweken van hogere planten in watercultures, waaraan men continu vers medium toevoegt en waarbij men het volume der cultuur constant houdt door een even snelle afvoer van

vloeistof. In dit geval treedt namelijk geen evenwichtstoestand in, doordat het groeiende wortelsysteem in de culture aanwezig blijft. Bij constante doorvoersnelheid van het medium zal dit wortelstelsel in verschillende fasen van ontwikkeling verschillende hoeveelheden mineralen uit het medium opnemen en men verkrijgt dus nooit een evenwichtstoestand.

Hetzelfde geldt voor schimmelcultures, welke men kweekt bij constante aanvoer en afvoer van medium, doch waarbij het groeiende mycelium in zijn geheel in het cultuurvat gehouden wordt. Ook hier wordt dus geen evenwichtstoestand bereikt en een dergelijke culture is eindig. Een continu cultuur in de strikte zin van het woord, waarbij dus continu vers medium wordt aangevoerd en verbruikt medium inclusief celmateriaal afgevoerd wordt, kan althans in theorie oneindig lang worden voortgezet.

In de praktijk blijkt echter, dat oneindig lang wel erg lang is, en dat het wenselijk kan zijn de cultivering na een periode van enkele maanden te staken. Deze wenselijkheid kan b.v. veroorzaakt worden door het optreden van moeilijkheden van technische aard ofwel door het voorkomen van infecties of ongewenste mutanten in de culture. Met mutant wordt bedoeld een organisme, dat genetisch afwijkt van het oorspronkelijke celmateriaal.

Het optreden van mutanten in bacteriecultures wordt begunstigd door een actieve stofwisseling van cellen, welke zich in het stadium van vermenigvuldiging bevinden. Daar aan deze voorwaarde voldaan wordt in continu cultures, is het dan ook niet verwonderlijk, dat men hierin niet alleen herhaaldelijk mutanten heeft aangetroffen doch dat men zelfs de techniek der continu cultivering toepast bij onderzoek over mutatie en selectie van micro-organismen.

Indien nu in een continu cultuur een mutant optreedt, die een grotere groeisnelheid vertoont dan de oorspronkelijke cellen, zal zich een nieuw evenwicht instellen, waarin de mutant het oorspronkelijk aanwezige organisme geheel vervangt.

Als dit gebeurt in een culture, waarin het te doen is om per tijdseenheid zoveel mogelijk cellen te produceren, zoals b.v. bij de productie van bakkersgist, dan kan dit een voordeel zijn.

Indien echter in een proces ter verkrijging van een microbiëel stofwisselingsproduct een weinig productieve doch snel groeiende mutant gevormd wordt, kan de productie nadelig beïnvloed worden.

De praktijkervaring van de laatste jaren heeft geleerd, dat het optreden van ongewenste mutanten zeer zeker niet van dien aard is, dat de techniek der continu cultivering voor practische doeleinden onbruikbaar is. Het volgende voorbeeld moge dit illustreren.

In reincultures van de boterzuurbacterie *Clostridium acetobutylicum* komen mutanten voor die gekenmerkt zijn door een weinig krachtig gistingsvermogen. De ervaring leert nu, dat bij het voort-

kweken van dergelijke reincultures vaak spoedig deze ongewenste mutanten uitgeselecteerd worden.

De vrees dat dit zich ook bij continu cultivering van *Clostridium acetobutylicum* zou voordoen bleek echter ongegrond. Uit recente onderzoeken is namelijk gebleken, dat na een gistingsperiode van 200 dagen, overeenkomend met 4000 generaties, nog geen teruggang in gistingcapaciteit opgetreden was. Er had zich zelfs een gunstige wending voorgedaan, in die zin, dat na 200 dagen de culture een drie maal zo hoge concentratie van het toxische stofwisselingsproduct butanol kon verdragen.

De techniek der continu cultivering biedt nieuwe perspectieven, zowel voor de bestudering van de levensuitingen van micro-organismen als voor de exploitatie van hun biochemische potenties. Zo kan men thans bij oecologische studies een organisme onder constante condities brengen en vervolgens de invloed van één enkele milieufactor op de groeisnelheid, morfologie en physiologie van het organisme bestuderen.

Verder zal continu cultivering goede diensten kunnen bewijzen bij de studie van de regulatie van de microbiële stofwisseling. Doordat men thans kan beschikken over celmateriaal, dat gedurende lange tijd in constante physiologische conditie verkeert, kan men een groot aantal analyses van b.v. enzymconcentraties uitvoeren, waardoor men in staat is bepaalde physiologische toestanden biochemisch te karakteriseren en te vergelijken.

Ook voor de technische microbiologie is het uiteraard van belang, dat men nu gedurende lange tijd micro-organismen in een gewenste physiologische toestand kan houden. Hier doet zich overigens nog wel eens de complicatie voor, dat milieufactoren, welke optimaal zijn voor de groei van een organisme in het geheel niet optimaal zijn voor de vorming van een gewenst stofwisselingsproduct.

Een dergelijke situatie doet zich bijvoorbeeld voor bij de cultivering van de bacterie *Aerobacter aerogenes*, die voor de groei condities nodig heeft waarbij sterk geaëreerd wordt en het medium neutraal is, terwijl voor de productie van butyleenglycol door dit organisme een beperkte aëratie en een enigszins zuur milieu nodig zijn. Aan dergelijke eisen kan voldaan worden door twee cultuurvatenvaten achter elkaar te schakelen, waarin achtereenvolgens aan beide voorwaarden voldaan wordt.

Dergelijke tweephase processen kunnen overigens wel eens minder effectief zijn dan op het eerste gezicht moge lijken. Bij de overgang van groeifase naar productiefase worden de cellen plotseling aan geheel andere milieufactoren blootgesteld. Hierdoor zal er veelal een zekere tijd verlopen voor de cellen tot de gewenste productie overgaan. Gezien het continu karakter van cultivering betekent dit, dat een aantal cellen de productiefase passeren zonder goed en wel aan productie toegekomen te zijn. In vergelijking met

een discontinu proces, waarin alle cellen een periode van maximale productie doormaken, is hier dus het continu proces in het nadeel.

Er is een duidelijk verschil in appreciatie van de continu cultivering waar te nemen tussen de meer academisch georiënteerde en de industriële microbiologen. Eerstgenoemde categorie beschouwt deze techniek terecht als een ideaal middel om de gedragingen van micro-organismen te bestuderen. De practicus echter is in de eerste plaats geïnteresseerd bij de vraag of een bepaalde techniek economische voordelen biedt of niet. En het blijkt, dat de economische voordelen van continu cultivering niet zonder meer van dien aard zijn, dat de gehele microbiologische industrie thans bezig is de apparatuur van discontinu tot continu om te bouwen. Dit neemt niet weg, dat ook in de industrie intensief geëxperimenteerd wordt met de continu methode van cultiveren.

Op het ogenblik vindt de continu cultivering voornamelijk toepassing bij de productie van celmateriaal zoals bij de gistfabricage. Ook de continu productie van bier lijkt aantrekkelijke perspectieven te bieden en ik zou hier gaarne nog een ogenblik bij stilstaan.

Zoals bekend gaat men bij de bereiding van bier uit van een extract van gekiemde gerst, genaamd wort. De vergisting hiervan vindt veelal plaats in grote kuipen volgens een discontinu proces. Sinds 1955 is echter ook hier een stijgende belangstelling voor continu productie waar te nemen.

Zo wordt b.v. volgens een Canadees patent van 1957 bier bereid in een continu proces, dat uit twee fasen bestaat. Men voert hier wort met constante snelheid in een tank welke geaëreerd wordt, zodat een conditie geschapen is, welke optimaal is voor de groei van de gist. Deze tank is door een overloop verbonden met een tweede, waarin anaerobe condities heersen en waar de eigenlijke bierproductie plaats vindt. De in het continu afgevoerde bier aanwezige gistcellen worden vervolgens afgescheiden. Een deel hiervan wordt weer met constante snelheid in het tweede gistingsvat teruggevoerd, waardoor de evenwichtsconcentratie van gistcellen in dit vat aanzienlijk wordt verhoogd. Dit maakt het mogelijk de wort met verhoogde snelheid door te voeren, hetgeen resulteert in een versnelde bierproductie.

Op het symposium over continu cultivering, dat dit voorjaar in Londen gehouden werd, heeft Hough mededeling gedaan over een in Engeland ontwikkelde methode tot continu productie van bier. Men heeft in dit proces geen gescheiden groei- en productiephase en ook worden hier geen gistcellen teruggevoerd in het gistingsvat. Desondanks kan men met deze methode meer dan tien maal zo snel bier produceren dan met de klassieke discontinu methode. Een van de oorzaken van deze productiever snelling ligt in het feit, dat in een continu proces de gisting kan plaats hebben bij temperaturen hoger dan 20° C, waardoor een snellere vergisting van de wort plaats

heeft. Gisting bij dergelijke hoge temperaturen geeft bij de discontinu methode een duidelijke kwaliteitsvermindering van het bier.

Helaas kan ik U uit eigen ervaring geen mededeling doen omtrent de kwaliteit van het continu geproduceerde bier. Geruchten hieromtrent rechtvaardigen echter hoopvolle verwachtingen.

Zeer geachte Toehoorders,

Bij de vervaardiging van voor onze samenleving belangrijke producten met behulp van micro-organismen gaat men veelal uit van aan de landbouw ontleende substraten. Gezien het feit, dat de zonne-energie nog lang niet uitgeput is, zal hieraan dus tot in verre toekomst geen gebrek zijn. Daar verder onze kennis van de biochemische potenties van micro-organismen nog slechts zeer onvolledig is, is er alle reden om te verwachten, dat de fascinerende ontwikkeling van de technische microbiologie, waarvan wij thans getuige zijn, nog slechts het begin is van een lange en vruchtbare groeifase.

Aan het einde gekomen van mijn openbare les wil ik in de eerste plaats mijn eerbiedige dank betuigen aan Hare Majesteit de Koningin voor mijn benoeming tot lector aan de Landbouwhogeschool.

Mijne Heren Leden van het Bestuur van de Landbouwhogeschool,

Gaarne wil ik hier mijn grote erkentelijkheid uitspreken voor het vertrouwen, dat U in mij gesteld heeft door mij voor deze functie voor te dragen. Gaarne wil ik ook mijn dank uitspreken voor de financiële steun, die U heeft willen verlenen voor het verrichten van technisch microbiologisch onderzoek op ons laboratorium. Ik moge U verzekeren, dat ik mijn beste krachten zal geven bij de uitvoering van mijn taak.

Dames en Heren, Hoogleraren, Lectoren en Docenten,

Ik beschouw het als een groot voorrecht, dat U mij in Uw gemeenschap heeft willen opnemen. Ik hoop met velen Uwer een prettig contact te kunnen onderhouden.

Hooggeleerde Mulder,

Het is mij een groot genoegen U hier dank te kunnen zeggen voor de vele, daadwerkelijke steun, die U mij gegeven heeft bij het leggen van een basis voor de afdeling technische microbiologie. Ik beschouw het als een eer en voorrecht om in mijn nieuwe functie een bijdrage te mogen leveren tot de opbouw van ons laboratorium. Het verheugt mij, dat ik hierbij tevens in staat zal zijn een deel van Uw zeer talrijke werkzaamheden over te nemen.

Zeergeleerde Wieringa,

U hebt mij zowel op wetenschappelijk gebied als door Uw persoonlijkheid een voorbeeld gegeven, dat mijn diepe bewondering

heeft. Ik prijs mij gelukkig, dat U Uw werkzaamheden op ons laboratorium zult voortzetten zodat ik, naar ik hoop, nog vaak van Uw veelzijdige kennis zal mogen profiteren.

Hooggeleerde van Niel,

Met zeer veel genoegen denk ik terug aan het jaar, dat ik op Uw laboratorium heb mogen werken. De vele uren, welke ik het voorrecht had met U over microbiologische problemen te discussiëren, waren voor mij bijzonder waardevol. Dat U ondanks Uw drukke werkzaamheden nog regelmatig tijd vindt om mij met Uw grote kennis ter zijde te staan, vervult mij met gevoelens van grote dankbaarheid.

Dames en Heren, Leden van het Personeel van het laboratorium voor microbiologie,

Onderwijs en onderzoek kunnen eerst dan volledig tot hun recht komen indien U hieraan Uw onmisbare steun verleent. Gaarne wil ik hier mijn dank uitspreken voor de voortreffelijke wijze waarop U mij steeds terzijde staat.

Dames en Heren Studenten,

Ik zou mij kunnen voorstellen, dat velen Uwer de consumptie van bier en wijn meer ter harte gaat, dan de studie van de microbiologische processen, welke aan de bereiding ten grondslag liggen, en dat U zich afvraagt of dit nu wel allemaal voor U van belang is.

Wat dat hier betreft zou ik U hier in de eerste plaats op willen antwoorden, dat bij een grote brouwerij, met bedrijven over de gehele wereld, een aanzienlijk deel der bedrijfsleiders uit Wageningse ingenieurs bestaat.

Verder heb ik mij vandaag uiteraard moeten beperken en U kunt op ons laboratorium vanzelfsprekend ook allerlei andere microbiologische processen bestuderen. Uw studievrijheid is hierbij in zoverre gewaarborgd, dat ik gaarne rekening zal houden met Uw speciale wensen.

Tenslotte zou ik nog dit willen zeggen. De technische microbiologie is een onderdeel van de biologie, dat sterk gericht is op wat men nut noemt. Ik kan U echter verzekeren, dat de studie van micro-organismen op zichzelf, of ze nu „nuttig” zijn of niet, een zeer speciale charme heeft. Ik beschouw het dan ook als mijn taak om diegenen onder U, die zich tot de technische microbiologie aangetrokken voelen niet alléén te leren hoe men micro-organismen pleegt te exploiteren; daarnaast zou ik Uw belangstelling en eerbied willen wekken voor het wonderbare samenspel van processen, dat de levende cel kenmerkt.

Ik heb gezegd.