
PASTEUR EN DE GENERATIO SPONTANEA



Louis Pasteur wordt in 1854 aangesteld tot decaan van en professor aan de kersvers opgerichte universiteit van Rijn-Elzass, centrum van het industrieel sterk ontwikkelde Noord-Frankrijk.

De universiteit telt een faculteit van *sciences appliquées*, volgens Pasteur een misleidend begrip: "Er is de wetenschap en er zijn haar toepassingen, onderling verbonden zoals een vrucht aan de boom die haar draagt". Hiermee reageert hij categoriek op zijn collega's die zweven bij de zuivere wetenschap en haar

praktische toepassingen van secundair belang achten.

Pasteur wijdt in zijn cursus een hoofdstuk aan de alcoholische gisting want Noord-Frankrijk verbouwt veel suikerbieten en bezit een aantal stokerijen. De vader van een van Pasteurs studenten is eigenaar van zo'n stokerij en soms ontstaat in zijn vaten een kwalijk riekend en zuur brouwsel ten koste van de opbrengst aan ethanol. Pasteur beantwoordt zijn noodkreet en gaat ter plekke het probleem aanpakken. Hij laat in dit onderzoek een frisse wind waaien door hierbij de microscoop te betrekken!

De melkzuurgisting

Pasteur herkent de typische cellen die de alcoholische gisting veroorzaken en waarvan Cagniard de Latour reeds in 1835 de voortplanting door knopvorming vastgesteld had.

Pasteur merkt dat naarmate de 'gezonde' gisting vordert er langwerpige en kleinere cellen ontstaan, die aanleiding geven tot de vorming van melkzuur.

Deze verbinding werd in 1780 door C.W. Scheele geïsoleerd uit verzuurde melk. Henri Braconnot, directeur van de plan-

tentuin van Nancy, ontdekt in 1813 onder meer in gistende rijst, bonen en erwten een stof die hij *acide de Nancy* of *acide nancéique* noemt, maar een slordig uitgevoerd onderzoek weerhoudt hem ervan dit zuur te vereenzelvigen met melkzuur. Gay-Lussac draagt bij tot de opheldering van de formule maar rept geen woord over de rol van de gist.

Pasteur stelt vast dat bij een te lage pH door het gevormde melkzuur ($pK_z = 3,86$) de gisting ophoudt. Toevallig leest hij dat door toevoegen van CaCO_3 het rendement verhoogt, want de neutralisatie met vorming van het beperkt oplosbaar calciumlactaat houdt de pH constant. Door nieuwe proeven isoleert Pasteur een grijsachtige troep, die zo compact is dat hij onder zijn microscoop geen gistcellen erin bespeurt. Toch neemt hij een weinig van deze massa, vermengt ze met een suikeroplossing, CaCO_3 en *eau de levure*, d.i. een helder filtraat van biergist waarin alle cellen door koken vernield zijn. Hij redeneert als volgt: biergistcellen leven en hebben dus voedsel nodig; waarom zouden de stikstof- en fosforverbindingen door de biergist gemetaboliseerd ook niet als voedingsbodem kunnen dienen voor de melkzuurgist? Naderhand vervangt hij zijn *eau de levure* door een mengsel van ammoniumzouten en fosfaten, wat tot meer reproduceerbare resultaten leidt.

Wanneer hij een suikeroplossing en *eau de levure*, maar zonder CaCO_3 aan de lucht blootstelt groeit hierin een allegaartje van verschillende types gistcellen en andere eencelligen en verkrijgt men ethanol en melkzuur. "*Ces globules prennent naissance spontanément au sein du liquide albuminoïde, fourni par la partie soluble de la levure de bière*". De pH moet zó precies zijn dat een lichte schommeling aanleiding geeft tot de ontwikkeling van een ganse waaier parasitaire eencelligen.

«Spontanément ...»

Pasteur voegt eraan toe dat hij geen toegevingen doet aan de aanhangers van de *generatio spontanea*, waarover het debat reeds eeuwen aansleept (Aristoteles, Van Helmont,...)

In 1671 maakt de Italiaanse arts-dichter Francesco Redi komaf met de *generatio spontanea*. Vóór hem geloofde men dat de wormachtige maden van vliegen spontaan in rottend vlees ontstaan. Hij plaatst in open en aan de lucht blootgestelde kolven stukjes vis, slangen- en kalfsvlees. Een tweede reeks kolven vult hij met dezelfde materie maar sluit ze af met een uiterst fijn gaasdoekje zodat er wel lucht maar geen vliegen bij kunnen komen. In deze reeks blijven de maden uit!

Op zijn beurt stelt René-Antoine Ferchault, comte de Réaumur, voorop dat wanneer een insect eitjes legt in een vrucht, de ontwikkelende larven de vrucht bederven; het is dus niet het fruit dat de eitjes tot leven brengt!

Lucht is leven

Vreemd genoeg blaast de ontdekking van de microscoop de hypothese van de *generatio spontanea* nieuw leven in: de mysterieuze "animalcula" doen nieuwe vragen rijzen!

De Engelse priester John Needham (1713-1781) experimenteert met allerlei organische materie en zelfs in kortstondig verwarmde en hermetisch afgesloten kolven ontstaat "nieuw leven". Hij schrijft het verschijnsel toe aan een niet verder gedefinieerde *vegetatieve kracht*. G.L. Buffon (1707-1788) leent hem een goed oor en langs deze weg worden Needhams opvattingen aanvaard en verspreid.

Lazzaro Spallanzani doet de proeven van Needham over, maar de kwaliteit van zijn glaswerk is blijkbaar beter en de afgesloten kolven weerstaan aan twee uur koken. Bij hem blijft de vorming van “nieuw leven” uit. Needham is overtuigd dat de hoge temperatuur de *force végétative* vernield heeft.

Voortgaande op de resultaten van François Appert die er als eerste in slaagt een fles erwten te conserveren door ze te verhitten en zo alle lucht eruit te verdrijven, besluit Gay-Lussac dat de *afwezigheid van zuurstof noodzakelijk is om plantaardige en dierlijke stoffen te bewaren*.

In Duitsland stelt Theodor Schwann echter vast dat zijn voedingsbodems niet gaan gisten of ontbinden in aanwezigheid van lucht die vooraf tot 300° verhit en regelmatig ververst wordt. Volgens hem is zuurstof op zichzelf dus niet schadelijk, maar wel een onbepaald “iets” dat in de lucht aanwezig is en door de warmte vernield wordt.

Franz Schulze voert lucht aan die vooraf geleid wordt doorheen een geconcentreerde KOH-oplossing en doorheen zwavelzuur. Zijn oplossingen blijven steriel: er ontstaan geen animalcula.

Heinrich Schröder en Th. Von Dusch leiden de lucht doorheen een prop watten in de aanvoerbuis. Afhankelijk van de voedingsbodem lopen de resultaten uiteen, wat een definitief besluit onmogelijk maakt. “Ik durf het niet aan een theorie voorop te stellen. Het is mogelijk dat lucht een actieve stof bevat die de suiker laat gisten of de putrefactie veroorzaakt, een stof die door de hitte vernield wordt of tegengehouden door een wattenfilter. *Gaat het hier om microscopische kiemen of om een scheikundige stof? Ik weet het niet*” besluit Schröder.

Pasteur diept alles verder uit. Het gaat voor hem zelfs niet meer om de gisting alleen, maar om het ontstaan van alle vorm van leven: schimmels, infusoriën. Zijn inspiratie bij het bedenken van proeven kent geen grenzen: hij onderzoekt op een ingenieuze wijze zowel de vervuilde straatlucht van Parijs als de zuivere lucht in het gebergte. Zijn besluit staat onwrikbaar vast: *het zijn levende wezentjes die naast roet-, stof- en zetmeel-deeltjes in de lucht voorkomen en de gistingen of putrefactio veroorzaken*.

De alcoholische gisting

Voor Lavoisier is suiker een oxide dat uit twee delen bestaat. Bij *la fermentation vineuse* wordt één stuk “gedeoxygeneerd” met vorming van alcohol, en wordt een tweede fractie geoxygeneerd waarbij CO₂ ontstaat. Aangezien deze reactie gemeenschappelijk is aan alle suikerhoudende stoffen, heeft het geen zin een onderscheid te maken tussen “esprit-de-vin”, “esprit-de-cidre” of “esprit-de-sucre-fermenté” en Lavoisier stelt als purist van de nomenclatuur de naam “alcool” voor. Lavoisier en Gay-Lussac hebben aangetoond dat er bij de gisting ethanol en CO₂ ontstaan, naast kleine hoeveelheden azijnzuur en melkzuur. Pasteur weerlegt dit categoriek en vindt dat slechts 94% van de suiker normaal vergist en dat er wel kleine hoeveelheden barnsteen zuur en glycerol gevormd worden.

Chemisch model van de fermentatie

De pijlsnelle groei van de koolstofchemie leidt in de 19de eeuw tot een aantal industrieel belangrijke syntheses en het vastleggen van de verhoudingsformule van veel verbindingen. De nodige aandacht gaat ook naar het catalogiseren van gegevens over fysiologisch materiaal.

Dit betekent daarom nog niet dat de biochemie reeds haar intrede gedaan heeft. Volgens Justus Von Liebig verlopen alle processen louter chemisch: wanneer een stof gevormd wordt of ontbindt, brengt ze een andere stof waarmee ze *in aanraking* is in dezelfde toestand. De actieve atomen van de ene stof beïnvloeden de atomen van de buurmoleculen waartegen ze botsen. Indien die even vatbaar zijn voor veranderingen als de eerste, ondergaan ze eveneens een transformatie waardoor nieuwe verbindingen ontstaan. We laten verder Von Liebig aan het woord: binnen de suikermoleculen heerst een bindingskracht of energie, de *vis inertiae*. Gist is een ingewikkelde organische verbinding, die wegens haar stikstofgehalte onstabiel is ⁽¹⁾ en gevormd wordt door de ontbinding van gluten. In aanraking met water geschiedt een tweede afbraak van gist. De vibratie van de ontbindende gistdeeltjes die botsen tegen de suikermoleculen, overwint de vis inertiae en zo breken de suikermoleculen af. In een oplossing die gluten bevat (zoals wort) ontstaat nieuwe gist door de botsing van de ontbindende suikerdeeltjes. Deze cyclus toont aan dat gist zich louter chemisch vermenigvuldigt en niet door een biologisch proces. De vorming van gist is het gevolg van de fermentatie en niet omgekeerd!

Tot zover Justus Von Liebig, die zijn leven lang biochemische processen als zuiver chemisch beschouwd heeft, hierin gevolgd door Eilhard Mitscherlich. Ook Berzelius sluit zich hierbij aan, maar Von Liebig houdt niet van het vage begrip

¹ Toen Liebig stage liep bij Gay-Lussac in Parijs, heeft hij een studie gemaakt over de fulminaten (zouten van HONC) en hun uitgesproken explosieve eigenschappen. Hij legde een verband tussen de onstabieliteit en de aanwezigheid van N in een verbinding. Tegelijkertijd was Wöhler cyaanuur HOCN aan het onderzoeken dat totaal andere eigenschappen bezit. Het kwam tot een (tijdelijk) hooglopende ruzie tussen Liebig en Wöhler, tot Berzelius de isomerie ontdekte.

“katalytische kracht”, dat eerder aan een invloed doet denken dan wel aan een concreet mechanisch contact.

De boterzuurgisting

In 1861 ontdekt Pasteur dat boterzuur ontstaat bij het ranzig worden van boter, waarbij bepaalde eencelligen die zich als fermenten gedragen geen zuurstof nodig hebben, noch om hun werking uit te oefenen, noch om zich te vermenigvuldigen.: “ *Non seulement ces infusoires vivent sans air, mais l'air les tue*”. Hij besluit dat deze wezentjes hun zuurstof rechtstreeks halen uit verbindingen zoals fosfaten. Deze soort bacteriën noemt hij *anaérobies* en de andere *aérobies*. Het valt hem op dat bij de alcoholische gisting zuurstof de vermenigvuldiging van de gist-cellen bevordert maar de omzetting van glucose tot alcohol doet dalen.

Azijn = vin aigre = vinaigre

Lavoisier had reeds ontdekt dat “*la fermentation acéteuse*” niets anders is dan het verbruiken van zuurstof door de wijn. In 1800 neemt Jean François Rozier de volgende proef: hij sluit op een deels verzuurd vat wijn een met lucht gevulde varkensblaas aan. Na enige tijd ontzwelt de blaas en wordt de wijn nog zuurder. In 1820 toont Edmund Davy (neef van Humphry Davy) aan dat platinaspons, alcohol omzet tot azijnzuur.

In 1823 hakt J.H. Doebereiner de knoop door: wijn wordt in aanwezigheid van zuurstof omgezet in azijnzuur en water: $C_2H_5OH + O_2 \rightarrow CH_3COOH + H_2O$. Naderhand wordt aangetoond dat ethanal als tussenproduct ontstaat.

Pasteur gaat uit van een mengsel van biergist (de voedingsbodem), azijn (om de pH te regelen) en alcohol. Aan de

lucht blootgesteld ontstaat een vlies dat microscopische wezentjes bevat die hij *mycoderma aceti* noemt. Hij treft ze ook aan op de houtschilfers gebruikt bij de Orléansmethode voor het maken van azijn. De houtschilfers vergroten het contactoppervlak tussen de reagentia.

Wanneer de reactie zo ver doorgaat, dat er onvoldoende alcohol in het mengsel overblijft, verbruikt de *mycoderma aceti* de azijn, met vorming van CO₂ en water. Voor een renderende gisting moet de hoeveelheid alcohol dus steeds op peil gehouden worden.

In 1861 neemt Pasteur een patent dat specificiert dat tijdens de azijnzuurgisting regelmatig alcohol (wijn of bier) moet toegevoegd worden. Te weinig alcohol laat aan *mycoderma aceti* de vrije loop voor: $\text{CH}_3\text{COOH} + 2 \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 875 \text{ kJ/mol}$

Zieke wijn

Wijn, dit roemrijk artikel dat de faam van Frankrijk in de wereld hooghoudt en met een jaarlijkse productie van $1,5 \cdot 10^{10}$ liter een steunpilaar van haar economie uitmaakt, blijkt niet steeds van dezelfde en goede kwaliteit te zijn en o.a. ontaardt bij het transport naar Engeland. Pasteur gaat in op het verzoek van Napoleon III om de oorzaken van die kwetsbaarheid te vinden en eraan te verhelpen. Met een beperkte team gaat hij gedurende verschillende jaren ernstig veldwerk uitvoeren om vanaf verse most tot wijn te onderzoeken wat er kan mislopen.

- Zure wijn is vooral het resultaat van de *mycoderma aceti*. Pasteur stelt voor om door een titratie het zuurgehalte te vergelijken met dat van 'goede' wijn; indien er niet meer dan 2g/liter azijnzuur aanwezig is, laat de wet toe een nauwkeurig afgemeten

hoeveelheid KOH toe te voegen om het zuur te neutraliseren.

- “*La pousse*” is gekenmerkt door de aanwezigheid van zijdeachtige slierten, door vorming van CO₂ en het verwateren van de wijn. De slierten zijn kolonies bacteriën die vooral tot ontwikkeling komen in de warme periodes, maar - specificiert Pasteur - als kiemen reeds vooraf aanwezig zijn op de druivenpel.
- Het komt voor dat witte wijnen olieachtig worden (“*ils filent comme de l’huile*”). Ook hier ontdekt Pasteur parasitaire bacteriën
- Indien het niet gaat over een natuurlijk verouderingsproces dat de kwaliteit van de wijn verbetert, kunnen een parasitaire bruine neerslag en een bittere smaak ontstaan die ingezet worden door de bacteriële afbraak van glycerol (*maladie de l’amertume*).

Pasteur beseft wel dat geringe hoeveelheden O₂ bijkomende reacties veroorzaken die de kwaliteit verbeteren. In 1865 neemt hij een octrooi op het kortstondig verhitten van wijn in gesloten flessen aan 60 tot 100° (afhankelijk van het alcohol-, zuur- en tanninegehalte) om de parasitaire ziekten te voorkomen. Het *pasteuriseren* is evenwel niet zijn uitvinding: hij kent de geschriften van Plinius die vermeldt dat verwarmde wijn beter bewaart en vóór Pasteur had François Appert met wijn in gesloten flessen gelijkaardige proeven uitgevoerd. Slechts later wordt deze bewaarmethode op melk toegepast.

Pasteur heeft door zijn procédé niet alleen de Franse wijnen in eer hersteld, maar de wijnkenners, die vreesden dat de kwaliteit zou achteruitlopen door het pasteuriseren, blijken heel verwonderd dat alle olfactorische en gustatieve eigenschappen er niet op achteruitgegaan zijn!

Besluit

De logica waarmee Louis Pasteur zijn proeven opbouwt om zijn hypothesen te staven weerspiegelt zijn heldere en kritische geest. Maar de evolutie van Pasteurs denken als scheikundige, tot zijn aanpak van een reeks biologische processen, maakt hem tot een der grondleggers van de biochemie. Het volstaat niet dat Anselme Payen (1795-1871) en Bessoz vóór hem het bestaan van dia-

stase aangetoond hebben, Pasteur heeft de rol van levende wezens in de chemische processen bewezen en verklaard. Het is bovendien zijn aanloop geweest tot het overschakelen naar de studie van een aantal besmettelijke ziekten. Enkele tientallen jaren na Pasteurs overlijden tonen de gebroeders Buchner aan dat niet noodzakelijk levende gist, maar enzymen binnen de gistcel de alcoholische gisting tot stand brengen.

Bibliografie

- *William BROCK* – “Justus von Liebig” – Cambridge University Press – 1997
- *P. DEBRÉ* – “Louis Pasteur” – Champs Flammarion , Parijs – 1994
- *Gerald GEISON* – “The Private Science of Pasteur” – Princeton University Press – 1995 (*)
- *LAVOISIER* - “Pages Choiesies” – Editions Sociales–Les Classiques du Peuple , Paris - 1974
- *J. NICOLLE* – “Pasteur: sa Vie, sa Méthode, ses Découvertes” – Marabout Université –1969
- *PASTEUR* – “Ecrits Scientifiques et Médicaux” – GF-Flammarion – 1994
- *M. VALLERY-RADOT* – “Pasteur” – Editions Perrin, Paris – 1994
- *E. VAN SCHOONENBERGHE* – “Jenever in de Lage Landen” – Stichting Kunstboek – 1996

(*) Een van de zeldzame niet-hagiografische studies over het werk van Pasteur. In “I Wish I’d made you angrier Early: Essays on Science, Scientists and Humanity” (Oxford University Press, 1998) vat de Nobelprijswinnaar chemie Max PERUTZ “*the deconstruction of Geisons deconstruction*” aan “*to restore[Pasteurs] rightly dominant image*”.

Yves De Cock
Rogierlaan 55
8400 Oostende