

DE SMAAK VAN DNA

door prof.dr.ir. A.J.J. van Ooyen



Inaugurele rede uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van bijzonder hoogleraar in de Genetische Technieken in de Levensmiddelen-technologie aan de Landbouwwuniversiteit te Wageningen op 16 september 1993.

DE SMAAK VAN DNA

Mijnheer de Rector Magnificus, Dames en Heren,

Inleiding

Met ons dagelijks voedsel nemen we allerlei stoffen tot ons, zoals eiwitten, koolhydraten en vitaminen. Naast deze bekende voedingscomponenten krijgen we tegelijkertijd ook een grote hoeveelheid DNA binnen. Bij het eten van bijvoorbeeld een appel of een vis consumeren we ook het erfelijke materiaal van dat organisme. Omdat mijn werk aan de LUW met DNA te maken heeft en bovendien in relatie tot de levensmiddelentechnologie staat, heb ik mijn oratie als titel "De smaak van DNA" meegegeven. En het spreekt vanzelf dat ik ook geproefd heb, hoe DNA smaakt. De uitslag van de smaak van DNA, meer specifiek van haring DNA, zal ik later geven maar eerst nog iets meer over DNA en wat je ermee kunt.

Ongeveer 50 jaar geleden ontdekte Oswald Avery, dat het DNA de drager van de erfelijke eigenschappen is (1). Op dat ogenblik was het nog onduidelijk, hoe DNA erfelijke informatie opslaat en doorgeeft. Onderzoek in de vijftiger en zestiger jaren heeft de moleculaire mechanismen volgens welke de erfelijkheid functioneert aan het licht gebracht. De ontdekking van de dubbel helix structuur van het DNA in 1953 door Watson en Crick was hierbij een mijlpaal. Voor onderzoekers zoals ikzelf, die de beginjaren van het moleculair-genetisch onderzoek niet bewust hebben meegemaakt, hebben de namen van de pioniers in deze tak van de wetenschap een welhaast mythologische klank gekregen. Zonder iets af te willen doen aan het baanbrekende werk in de vijftiger en zestiger jaren, wil ik mijn verhaal beginnen in het jaar 1973, dat algemeen

beschouwd wordt als het geboortjaar van de recombinant DNA technologie. De recDNA technologie kan gedefinieerd worden als de verzameling technieken die het mogelijk maakt om in vitro stukken DNA aan elkaar te koppelen en vervolgens te vermeerderen. In 1973 slaagden onderzoekers van de Universiteit van Stanford in Californië er in om stukjes vreemd DNA in een plasmied in te bouwen en te vermeerderen met behulp van de bacterie *Escherichia coli*. Vanaf dat ogenblik kon in principe elk stuk DNA van ieder organisme geïsoleerd en vermeerderd worden, wat enorme nieuwe mogelijkheden voor de wetenschap opleverde. Ikzelf verkeerde twintig jaar geleden in de gelukkige omstandigheid, dat ik net met mijn promotie-onderzoek begonnen was aan het biochemisch laboratorium van de Universiteit van Groningen na in Wageningen plantenziektenkunde gestudeerd te hebben. Het onderzoek in Groningen opende mijn ogen voor de mogelijkheden van de recDNA technologie voor het wetenschappelijk onderzoek. De snelheid van de ontwikkelingen in deze jonge technologie blijft mij tot de dag van vandaag verbazen. De commerciële mogelijkheden van de recDNA technologie waren ook al snel duidelijk en de eerste octrooi-aanvraag werd in 1974 ingediend door de bovengenoemde Universiteit van Stanford (2). De aanvraag werd in 1980 toegekend en ze heeft deze Amerikaanse universiteit geen windeieren gelegd. Inmiddels zijn er duizenden octrooi-aanvragen ingediend op dit gebied, wat op de brede toepasbaarheid wijst. Op dit ogenblik is er ook al een groot aantal producten op de markt, die met behulp van zogenaamde genetisch gemodificeerde organismen gemaakt worden. De enorme mogelijkheden die aanvankelijk aanwezig leken te zijn, zijn tot nu toe

evenwel nog niet helemaal waar gemaakt, hoewel de tijd daarvoor ook nog wel wat kort is geweest. Ik wil vandaag met u de opkomst van de recombinant DNA technieken nog eens doorlopen met de nadruk op het belang voor de levensmiddelentechnologie. In dit verband is het gepast om, behalve over technische aspecten, ook iets te zeggen over de discussies die in de wetenschappelijke wereld en in de maatschappij rond deze techniek plaats vinden en gevonden hebben. Uit dit alles zal dan volgen hoe ik mijn rol als part-timer aan de Landbouwniversiteit zie.

De dynamiek van DNA

Zoals reeds boven vermeld is, zijn de erfelijke eigenschappen opgeslagen in het DNA, waarvan in 1953 de structuur opgehelderd is. DNA moleculen zijn in wezen tamelijk eenvoudige structuren, bestaande uit slierten van een viertal bouwstenen, de nucleotiden, die in paren (baseparen) voorkomen. Een betrekkelijk eenvoudig organisme, zoals bakkersgist bevat ongeveer 14,5 miljoen baseparen in het DNA, verdeeld over 16 chromosomen. Deze variëren in lengte van ongeveer 229 duizend tot 3 miljoen baseparen. Ter vergelijking: een mens heeft ongeveer 3 miljard baseparen per cel. De erfelijke eigenschappen van een individu worden bepaald door de volgorde van de nucleotiden in het DNA. Door invloeden van buiten, maar ook bij geslachtelijke en ongeslachtelijke vermeerdering van de cellen treden er veranderingen in het DNA op. Het DNA, of liever de DNA volgorde van een organisme is in de loop van de tijd dus aan voortdurende veranderingen onderhevig. Dit leidt ertoe, dat binnen een soort vele verschillende individuen ontstaan met aanzienlijke

verschillen in hun DNA volgorde. De veranderingen of mutaties leiden ook tot het ontstaan van nieuwe soorten.

Van de natuurlijke dynamiek in het DNA maakt de mens al vele jaren gebruik om de natuur in een door hem gewenste richting te veranderen. Dit is met name het geval in de landbouw, waar planten en dieren via gerichte veredelingsprogramma's geoptimaliseerd worden op gewenste eigenschappen, zoals bijvoorbeeld melkproductie. Maar ook bij huisdieren, zoals honden, kan men zien waartoe een gerichte opfok kan leiden.

Deze zogenaamde veredeling vindt niet alleen plaats bij planten en dieren, maar ook bij micro-organismen. Een bekend voorbeeld van het laatste is de bakkersgist, die geoptimaliseerd is voor de productie van koolzuurgas tijdens het bereiden van brood. Bij veredeling van micro-organismen wordt de natuur vaak een handje geholpen door een behandeling met mutagene agentia, zoals UV straling.

Het DNA van een soort is dus geen statisch geheel. Integendeel, er is in de natuur een aantal mechanismen aan het werk dat ervoor zorgt, dat er voortdurend kleine veranderingen in het DNA optreden. In de klassieke veredeling wordt daarvan al vele jaren gebruik gemaakt. Ook in de recombinant DNA technologie wordt veelal gebruik gemaakt van gereedschappen, zoals enzymen, die door de natuur aangereikt worden. Men zou dus kunnen zeggen dat er niets nieuws onder de zon is. In zekere zin is dat ook zo. De recDNA technologie maakt evenwel gericht ingrijpen in het DNA mogelijk in de reageerbuis, evenals het combineren van DNA van allerlei organismen. Dit is met de klassieke veredeling niet mogelijk.

Kijkend naar het resultaat is er een geleidelijke overgang tussen de klassieke veredeling en de recDNA technologie. Sommige resultaten kunnen met beide technologieën behaald worden, andere alleen met een van beide.

De opkomst van de recombinant DNA technologie

De recombinant DNA technologie was een feit toen in vitro DNA fragmenten gecombineerd en vervolgens vermeerderd konden worden. Het doet er voor de in vitro recombinatie niet toe of de DNA fragmenten van eenzelfde soort afkomstig zijn of van verschillende soorten, want de bouwstenen van het DNA zijn bij alle soorten dezelfde.

In de eerste jaren van het recDNA onderzoek waren de mogelijkheden van de recDNA technologie nog vrij beperkt. De voornaamste attractie bestond erin, dat men onbeperkte hoeveelheden DNA fragmenten van een bepaald organisme in handen kon krijgen en bestuderen. Gezien de potentie van de technologie evenwel en omdat de commerciële successen en de Nobelprijzen voor het oprapen leken, stortten zich vele onderzoekers op de technologie en gingen de ontwikkelingen vervolgens razendsnel.

Het onderzoek ging een nieuwe fase in met de ontdekking van nieuwe mogelijkheden om DNA volgordes te bepalen. In het begin van de zeventiger jaren kon men nog promoveren op de bepaling van de volgorde van een DNA fragment van enige tientallen baseparen. Met de nieuwe methodes van Maxam en Gilbert (3) en die van Sanger (4) konden betrekkelijk eenvoudig stukken DNA van duizenden baseparen gesequenced worden. Hierdoor kon de structuur van hele genen opgehelderd worden. Ook kon een

onderzoeker na een ingreep in het DNA gedaan te hebben achteraf precies nagaan wat hij gedaan had. Zo werden gerichte veranderingen in het DNA mogelijk. In deze fase van de recDNA technologie is dan ook veel bekend geworden over de structuur en expressie van genen.

Momenteel bevinden we ons in de derde fase van de technologische ontwikkeling. Deze wordt gekenmerkt door de automatisering die zijn intrede heeft gedaan in de laboratoria. DNA synthese en sequentie-apparatuur evenals pipetteerrobots zijn gemeengoed aan het worden. Deze ontwikkeling wordt versneld door de ambitieuze sequentieprogramma's die wereldwijd gestart zijn. Zo is er in Europa een initiatief van de grond gekomen om het bakkersgist genoom te sequencen. Als eerste is hierbij de DNA volgorde van chromosoom III bepaald (5). Het gist genoom project zal over een paar jaar afgerond zijn. Nog veel ambitieuzer is het zogenaamde HUGO (human genome) project, dat zich tot doel stelt de volgorde van het menselijke genoom te bepalen (3 miljard baseparen) (6). Hoewel er bij dergelijke megaprojecten vraagtekens gezet kunnen worden is het duidelijk, dat de verkregen informatie van groot nut zal zijn bij het ophelderen van de processen die zich in de cel en tussen cellen afspelen.

Wat de nieuw opgedane kennis ons vooral ook geleerd heeft, is dat de processen en regulatiemechanismen in de cel veel complexer zijn dan eerder gedacht werd en dat er grote verschillen zijn tussen verschillende soorten organismen. Kennis over structuur en regulering van genen leidt evenwel nog niet automatisch tot praktische toepassingen. Zo is er de laatste jaren bijvoorbeeld veel bekend geworden over het

ontstaan van een aantal erfelijke ziekten zonder dat dit tot grote vorderingen in de behandeling geleid heeft.

Toepassingen van de recDNA technologie

De recDNA technologie heeft, zoals boven reeds gemeld, zowel in wetenschappelijk, als in commercieel opzicht een grote invloed. Bij toepassingen van een nieuwe technologie in het bedrijfsleven spelen in de beginfase de onderzoekers een sleutelrol. Zij zijn bij uitstek in staat om de nieuwe mogelijkheden aan te geven en om deze dan vervolgens ook te realiseren. Een wetenschappelijk succes leidt evenwel lang niet altijd tot een commercieel succes. De effectiviteit van een nieuw farmaceutisch eiwit blijkt bijvoorbeeld pas in klinische proeven. Dit is jaren nadat de eerste successen aan de labtafel behaald zijn. In een wat latere fase van een nieuwe technologie worden de mogelijkheden en onmogelijkheden ook aan de commerciële kant steeds duidelijker en verschuift het initiatief deels van de labtafel naar het bureau. De zuivere technology push situatie krijgt geleidelijk elementen van market pull.

Laat ons evenwel nog even stilstaan bij de beginjaren van de recDNA technologie. In die tijd waren vele vragen onbeantwoord bij de start van een project, dat zich bezig hield met de expressie van een vreemd eiwit in een bepaalde gastheer. Voorbeelden van deze vragen zijn:

- Is het opgenomen DNA stabiel in de gastheer cel?
- Hoe hoog is het expressieniveau?
- Is het tot expressie gebrachte eiwit actief?
- Hoe zit het met de stabiliteit van het eiwit?

- Vormt de secundaire modificatie, bijvoorbeeld de glycosylering een probleem?
- Wordt het eiwit uitgescheiden?

Bovenstaande elementen kunnen leiden tot een aantal problemen en de onderzoekers in het bedrijfsleven dienen hiervoor een oplossing te vinden. Typisch voor het onderzoek in het bedrijfsleven is, dat gewerkt wordt in multi-disciplinaire teams. Een gevolg hiervan is, dat de oplossing voor een probleem vaak uit een ander vakgebied komt dan waar het probleem zich het eerste voordeed. Hiervan zal ik later een voorbeeld geven.

Eind jaren zeventig, begin jaren tachtig waren de wilde jaren van de recDNA technologie. De mogelijkheden leken onbegrensd en er werden honderden bedrijfjes opgericht, met name in de USA, om de commerciële vruchten te plukken van de nieuwe produkten die zouden komen. Deze nieuwe firma's wilden zich graag profileren als voortrekkers, wat zij onder andere deden via het publiceren van hun onderzoeksresultaten. Dit contrasteert sterk met de gewoonte in de gevestigde bedrijven die in het algemeen veel terughoudender zijn met het publiceren van hun verrichtingen. Dat dit wel eens tot frustratie bij de onderzoekers in de gevestigde bedrijven leidde zal duidelijk zijn. De eerlijkheid gebiedt evenwel te zeggen, dat in de beginjaren de nieuwkomers duidelijk het initiatief hadden. Inmiddels krijgt de gevestigde orde evenwel een steeds grotere greep op de zaak en slinkt het aantal nieuwkomers, dat zijn oorspronkelijke ambitie: uitgroeien tot een zelfstandige farmaceutische onderneming nog denkt te kunnen waarmaken, zienderogen.

De farmaceutische industrie is natuurlijk bij uitstek geschikt om de ontwikkeling van een nieuwe technologie te dragen. Zij is namelijk in staat om de zeer hoge kosten, die hiermee gepaard gaan, terug te verdienen. Nadat de technologie wat verder ontwikkeld is en de onzekerheden en kosten daardoor aanzienlijk gereduceerd, kunnen andere bedrijfstakken die werken met veel kleinere "Research and Development" budgetten zich bij de nieuwe ontwikkelingen aansluiten. Illustratief in dit verband is, dat het Amerikaanse bedrijf Genentech, dat zich bezighoudt met de productie van farmaceutische eiwitten later een dochter Genencor kreeg, die zich op industriële enzymen richt.

Zonder volledig te willen zijn volgt hier een samenvatting van de commerciële toepassingsgebieden van de recDNA technologie:

- Farmaceutische toepassingen, met name farmaceutische eiwitten zoals insuline, menselijk groeihormoon, t-PA en erythropoetine.
- Industriële enzymen voor bijvoorbeeld wasmiddelen, de verwerking van zetmeel tot fructose, de veevoedingsbedrijven, de productie van papier en de textielindustrie.
- In de landbouw worden grote mogelijkheden gezien voor transgene planten met een verbeterde ziektenresistentie of met verbeterde verwerkings-eigenschappen.
- De levensmiddelentechnologie.

Aan het laatste onderwerp wil ik de rest van mijn voordracht wijden, aangezien mijn leeropdracht luidt: "Genetische Technieken in de Levensmiddelen-technologie". In dit kader wil ik een drietal voorbeelden geven waaraan ik zelf gewerkt heb en tot

slot ingaan op de toekomstperspectieven voor dit gebied, mede in het licht van de maatschappelijke acceptatie.

Modeliwit chymosine

Chymosine is een enzym, dat gebruikt wordt bij de bereiding van kaas. Het zorgt ervoor, dat de melk stremt, en wordt daarom ook wel stremsel genoemd. Het stremsel, dat van oudsher in de kaasindustrie gebruikt wordt, wordt gewonnen uit de maag van jonge kalveren. Naast het traditionele kalvermaagextract is er ook een stremsel van microbiële oorsprong op de markt, dat iets goedkoper is dan het kalvermaagextract. Het microbiële enzym wijkt in zijn werking iets af van dat uit kalvermagen, waardoor het niet geschikt is voor alle soorten kaas.

Sinds 1988 is er ook chymosine op de markt, dat gemaakt wordt met behulp van recDNA technieken. Het is, voorzover ik weet, het meest bekende recDNA produkt, dat in de levensmiddelenindustrie gebruikt wordt en het verdient daarom de titel van modeliwit. De geschiedenis van het recDNA chymosine begint rond het jaar 1980. Toen is namelijk een aantal bedrijven begonnen met projecten die tot doel hadden om chymosine met behulp van micro-organismen te maken. Hiertoe dient eerst het DNA, dat voor chymosine codeert, geïsoleerd te worden. Ik zal dit in het vervolg het chymosinegen noemen, hoewel het in strikte zin niet het echte gen is, maar een kopie van het mRNA dat codeert voor chymosine. De isolering van het chymosinegen is een aantal bedrijven kort na elkaar in 1981 gelukt. Een van die bedrijven was een gevestigd bedrijf, het Nederlandse Unilever, de andere waren beginnende bedrijfjes. Met de isolering van het

gen was de eerste stap gezet naar de produktie van chymosine via micro-organismen.

Begin jaren 80 kwamen er nog niet zo veel micro-organismen in aanmerking voor de expressie van een heteroloog gen en er is voor chymosine veel onderzoek gedaan aan de op dat ogenblik toegankelijke bacterie *Escherichia coli* en de gist *Saccharomyces cerevisiae*. Dit type onderzoek kwam er in eerste instantie vooral op neer, dat men een aantal expressiesignalen, waarvan men wist, dat ze in het desbetreffende organisme goed werkten voor het heterologe gen zette. Vervolgens was het afwachten hoe goed het desbetreffende organisme het zou gaan doen. Afhankelijk van het resultaat kon men besluiten te proberen de expressie te maximaliseren. Hiervoor was en is er in beginsel een aantal mogelijkheden. Naarmate uit het fundamentele onderzoek meer bekend wordt over de factoren die een rol spelen bij de expressie van genen in een bepaald organisme, groeien de mogelijkheden voor het toegepast onderzoek ten behoeve van de verhoging van de genexpressie. Men weet a priori evenwel niet of de gekozen methodes zullen werken. Het principe van heterologe genexpressie was aanvankelijk vooral trial and error. Dit is tot op zekere hoogte nog steeds zo. De kennis over genexpressie, het aantal mogelijke gastheren en de snelheid van werken zijn evenwel steeds groter geworden, waardoor de kansen op succes aanmerkelijk toegenomen zijn.

Voor de heterologe genexpressie van chymosine leek *Escherichia coli* aanvankelijk niet zo'n gelukkige keuze. In *E. coli* wordt het enzym wel aangemaakt en ook in aanzienlijke hoeveelheden, maar het is grotendeels inactief ten gevolge van een verkeerde vouwing. Later heeft men een methode gevonden om

het inactieve produkt via denaturatie en renaturatie te activeren. Deze methode wordt voor het *E. coli* produkt momenteel toegepast door het Amerikaanse bedrijf Pfizer. Het is een van de voorbeelden waar ik het eerder over had, namelijk dat anderen, in dit geval eiwitchemici, de problemen gecreëerd door de moleculairbiologen oplossen. Liever doen de moleculairbiologen dit uiteraard zelf.

Bij het werken met *S. cerevisiae* trad het probleem op, dat chymosine door deze gist zeer slecht uitgescheiden wordt. De oplossing hiervoor is gevonden in de keuze van een andere gastheer, de zogenaamde melkgist *Kluyveromyces lactis*. Deze wordt al vele jaren industrieel toegepast voor de produktie van het enzym lactase, dat in staat is lactose in melk af te breken. Deze gist is ook door andere toepassingen voor het gebruik in voedingsmiddelen geheel onverdacht. Onderzoekers onder leiding van Prof. Dr. C. Hollenberg hadden een transformatie-systeem voor deze gist ontwikkeld (7). Toen medewerkers van Gist-brocades in samenwerking met die van het Amerikaanse bedrijf Chiron het chymosinegen, voorzien van een signaalsequentie voor eiwitsecretie in *K. lactis* ingebracht hadden, bleek deze gist het chymosine wel in een actieve vorm te kunnen uitscheiden (8). Vooralnog is onbegrepen waarom *K. lactis* chymosine beter kan uitscheiden dan *S. cerevisiae*, maar de eerste gist verdient daardoor wel de voorkeur. Een uitgescheiden actief produkt heeft namelijk een aanzienlijk eenvoudiger opwerkingsroute dan een intracellulair en inactief produkt, zoals duidelijk zal zijn.

Een derde micro-organisme, waarin de heterologe expressie van chymosine gelukt is, is de schimmel *Aspergillus niger*. Dit is ook een goede bekende in de

levensmiddelenindustrie. Met behulp van deze schimmel worden namelijk een aantal enzymen gemaakt die bij de verwerking van levensmiddelen gebruikt worden. Het voornaamste probleem bij de expressie van chymosine in *A. niger* was het lage uiteindelijke niveau van een overigens actief eiwit in het medium. Dit lage niveau was de resultante van een enerzijds hoog expressieniveau, maar anderzijds een sterke afbraak. Moleculairbiologen bij Genencor hebben een tweetal methoden bedacht om de afbraak te verlagen. In de eerste plaats bleek de afbraak van chymosine enorm te verminderen als het als fusie-eiwit aan een homologe eiwit werd gehangen. Het homologe eiwit beschermde de heterologe gast tegen afbraak. Daarnaast bleek ook de uitschakeling van een proteasegen de hoeveelheid actief chymosine in het medium te verhogen. Vanaf dit punt is het werk overgenomen door de klassieke genetici die er via random mutagenese en selectie in geslaagd zijn het niveau van chymosine in het medium nog aanzienlijk op te voeren.

Uit de boven geschetste gang van zaken bij de heterologe expressie van chymosine ten behoeve van de ontwikkeling van een industrieel proces kunnen drie conclusies getrokken worden:

1. Het aantal keuzemogelijkheden voor een goede gastheer ten behoeve van de expressie van een heteroloog gen is zodanig groot, dat er vaak meerdere mogelijkheden zijn om een aanvaardbaar resultaat te bereiken. Bij de keuze van de gastheer spelen naast moleculair-biologische overwegingen ook andere aspecten een rol. Dit kunnen technische

elementen zijn, zoals gedrag bij grootschalige fermentatie en opwerking, maar ook zaken als octrooisituatie en toelating.

2. Een aantal van de problemen die kunnen optreden, zoals een inactief eiwit of de afbraak van het produkt, kunnen door de moleculair bioloog, maar ook de anderen opgelost worden. Dit kunnen, zoals in het chymosinevoorbeeld eiwitchemici zijn, maar in andere gevallen kan fysiologisch onderzoek de oplossing leveren.
3. Bij de verhoging van de genexpressie komen de moleculair biologen de klassieke genetici weer tegen, die ze aanvankelijk brodeloos gemaakt dachten te hebben.

Inmiddels is er een drietal chymosinepreparaten, gemaakt met de moderne genetische technieken op de markt. In de USA hebben ze alle drie de GRAS (Generally Recognized As Safe) status gekregen van de FDA (Foods and Drugs Administration). Daarnaast zijn er nog vele aanbieders van het klassieke kalvermaagextract. Hiermee hebben de kaasfabrieken een ruime keuzemogelijkheid gekregen in chymosinepreparaten en ik verwacht dan ook niet, dat er op korte termijn nog meer aanbieders van recDNA geproduceerd chymosine zullen komen. In de USA werd voor de komst van het recDNA chymosine ongeveer 60% van de kaas gemaakt met kalvermaag-enzym en 40% met microbiel stremsel. Het recDNA enzym, dat identiek is aan het kalvermaagextract heeft momenteel ongeveer 30% van de totale markt veroverd en heeft in de USA dus een even groot marktaandeel als kalvermaagextract.

Bij de toepassing van produkten gemaakt met behulp

van recDNA technieken in de levensmiddelenindustrie heeft chymosine een voortrekkersrol vervuld en zij doet dat nog steeds. Hierbij is een aspect naar voren gekomen, waarmee begin jaren 80 nog weinig onderzoekers rekening gehouden hadden, namelijk dat van de consumentenacceptatie. Ik kom op dit punt later nog uitgebreider terug. Bij het voorbeeld chymosine is het evenwel passend te vermelden, dat de praktijk geleerd heeft, dat de acceptatie van land tot land sterk verschilt. In een land als de USA blijken er vrijwel geen problemen op te treden, terwijl het onderwerp recombinant DNA in Duitsland op dit moment nog zeer gevoelig ligt. Hierdoor is het recombinant chymosine daar nog niet op de markt. Over de oorzaken van deze verschillen tussen landen kan ik weinig zeggen. Dit is meer iets voor psychologen.

Andere voedingsmiddeltoepassingen

Er is in principe een groot aantal mogelijke toepassingen van de recDNA technologie in de levensmiddelentechnologie. De introductie van recDNA producten in de levensmiddelentechnologie verloopt vooralsnog evenwel tamelijk moeizaam, mede gezien de onduidelijke situatie rond de consumentenacceptatie.

Op dit punt wil ik nog even terugkomen op de smaaktest die ik gedaan. Ik heb geen smaak kunnen ontdekken aan het haring DNA. De conclusie uit dit wetenschappelijk wellicht niet geheel betrouwbare experiment is, dat DNA geen smaak heeft. In dat opzicht zal er geen verschil zijn tussen "normaal" DNA en recombinant DNA. De consumentenacceptatie kan dus niet aan de smaak van het DNA

liggen. Wat is dan wel de oorzaak van de problemen?
Later meer hierover.

Als afsluiting van het deel over voedingsmiddelen-toepassingen wil ik hier in het kort nog iets zeggen over een tweetal onderwerpen, waarop ik zelf de komende jaren actief hoop te zijn in Wageningen.

Op het gebied van de plantecelwand afbrekende enzymen bestaat al enige jaren een intensieve samenwerking tussen de Landbouwuniversiteit en Gist-brocades. Hierbij zijn de groepen van Prof. A.G.J. Voragen en Dr. J. Visser betrokken. De samenwerking heeft al geleid tot een aanzienlijk aantal publikaties en octrooi-aanvragen, wat erop wijst, dat universiteit en bedrijfsleven heel goed tot beider voordeel kunnen samenwerken.

Plantecelwanden zijn complexe structuren die van plant tot plant grote verschillen vertonen. De complexiteit van plantecelwanden wordt weerspiegeld in het grote aantal verschillende enzymen, dat nodig is om ze volledig af te breken. De enzymen worden grofweg in drie verschillende klassen onderverdeeld: pectinases, cellulases en hemicellulases. Van elke klasse is er een aantal vertegenwoordigers, waarbij de klasse der hemicellulases de grootste is. Micro-organismen, zoals de eerder genoemde schimmel *Aspergillus niger*, die goed op plantenmateriaal kunnen leven, zijn in staat om de complexe enzymmengsels te produceren, die nodig zijn om plantecelwanden af te breken.

Het feit, dat de produktie-organismen complexe enzymmengsels uitscheiden, maakt het moeilijk de rol van de individuele enzymen op te helderen. Zuiveringen leveren vaak slechts minimale

hoeveelheden enzym op, die gecontamineerd kunnen zijn met verwante activiteiten. Zonder zuivere enzymen kan de rol van individuele enzymen bij de afbraak van plantecelwanden evenwel niet bepaald worden. Klonering en overexpressie van deze enzymen met behulp van de recDNA technologie kan hierbij uitkomst bieden. De overexpressie in een geschikte gastheer kan de zuivering aanmerkelijk vereenvoudigen.

Plantecelwand afbrekende enzymen spelen in een aantal verschillende bedrijfstakken een rol. Het meest bekend is waarschijnlijk de rol van pectinases in de vruchtensappenindustrie. Hemicellulases, zoals endoxylanases worden gebruikt bij zo diverse toepassingen als het bakken van brood, het brouwen van bier, de veevoeding en het scheiden van lignine van cellulose in de papier industrie. Als voorbeelden van het gebruik van cellulases noem ik de veevoeding, de textiel- en de wasmiddelenindustrie. Bij de plantecelwand afbrekende enzymen sluiten wetenschap en toepassing mooi op elkaar aan. Gekloneerde enzymen kunnen zowel in het fundamenteel wetenschappelijk onderzoek gebruikt worden alsook aanknopingspunten bieden voor commercialisering. Het is mede door het pionierende werk van Prof. W. Pilnik aan de LUW geweest (9), dat enzymen zo'n grote vlucht genomen hebben bij de bereiding van vruchtessappen. De trend in de appelsapindustrie naar een totale liquefactie van de appel zal de belangstelling voor deze enzymen alleen maar doen toenemen. In de samenwerking tussen Gist-brocades en de vakgroep Levensmiddelentechnologie is duidelijk geworden, dat naast de bekende enzymen, zoals pectinases en arabinases, ook een nieuwe soort enzymen, de xyloglucanases, een belangrijke rol bij

de totale vervloeiing van appels kunnen spelen. Uit het bovenstaande zal duidelijk zijn, dat plantecelwand afbrekende enzymen een belangrijke rol spelen in bepaalde onderdelen van de levensmiddelen-industrie voor de verwerking van het uitgangsmateriaal tot het uiteindelijke produkt. Gezien het onderzoek op dit gebied, waarbij steeds nieuwe enzymactiviteiten ontdekt worden en de mogelijkheden om deze enzymen goedkoop en zuiver te produceren met behulp van de recDNA technologie, zal het belang ervan alleen maar toenemen. Ik hoop vanuit mijn huidige positie nog veel aan dit onderzoek aan de LUW te kunnen bijdragen.

Onlangs is in de sectie Industriële Microbiologie van de vakgroep Levensmiddelentechnologie onderzoek gestart naar de produktie van kleurstoffen door micro-organismen. De produktie van kleurstoffen, zoals carotenoïden, via al dan niet genetisch gemodificeerde micro-organismen biedt een interessant alternatief voor de chemische produktie. Enerzijds worden de micro-organismen gekweekt op hernieuwbare C-bronnen in de vorm van bijprodukten uit de agrarische produkten verwerkende industrie, zoals melasse en maisweekwater. Anderzijds zouden micro-organismen complexe verbindingen, zoals kleurstoffen wel eens goedkoper kunnen maken dan de chemische industrie mits zij daartoe op adequate wijze geprogrammeerd zijn.

Onderzoek in bacteriën heeft geleerd, dat in deze organismen enzymen die coderen voor een bepaalde kleurstof, zoals bèta-caroteen vaak geclusterd liggen. Over de organisatie en regulering van genen voor kleurstoffen in eukaryoten, zoals gisten en schimmels is vrij weinig bekend. Te verwachten is evenwel, dat

ze onder een bepaalde gemeenschappelijke regulering vallen. Het is op dit gebied, dat ik mijn beperkte onderzoeksinspanning in de sectie Industriële Microbiologie wil richten.

Naast het bovengenoemde eigen onderzoek zal ik uiteraard ook een bijdrage leveren aan de rest van het onderzoek in de sectie. In het lopende programma zijn er vele mogelijkheden om het onderzoek te verdiepen door toepassing van de recDNA technologie. Ook naar het onderwijs in de sectie gaat mijn belangstelling uit. Hierbij denk ik aan het onderwijs-element "Geïntegreerde levensmiddelen-technologie" en het door de sectie verzorgde college "Industriële toepassingen van genetisch gemodificeerde micro-organismen". We hopen dat via deze onderwijsbijdragen vele afstudeerders hun weg zullen vinden naar de sectie.

Regulering van de recombinant DNA technologie

Wie nog eens wil meebeleven, hoezeer de recombinant DNA technologie in de zeventiger jaren de wetenschappelijke wereld gespleten heeft, leze het boek van Watson en Tooze: *The DNA Story* (1). De eerste reactie van onderzoekers toen het mogelijk bleek om in een reageerbuis recombinant DNA moleculen te produceren was er een van opwinding over de nieuwe mogelijkheden. Tegelijkertijd werd er evenwel tot voorzichtigheid gemaand. Kon men met de nieuwe technologie behalve goede ook geen slechte dingen doen? Ja, kon de wereld via deze technologie bedoeld dan wel onbedoeld niet door grote rampen getroffen worden? In de USA leidde deze discussie ertoe, dat de onderzoekers besloten tot een

moratorium, ofwel een stop op dit soort experimenten. Dit moratorium duurde slechts korte tijd. In Europa waren de reacties wat minder heftig en volgde men aanvankelijk de gedachtenvorming in de USA. De discussies in de wetenschappelijke wereld trokken uiteraard ook de belangstelling van de pers en de politiek. Dit resulteerde in de roep om regulering van dit soort onderzoek. De regulering moest tot doel hebben de vermeende gevaren zoveel mogelijk te beperken. Inperking van de risico's kon plaats vinden via fysische inperking, dat wil zeggen door te werken in speciaal beveiligde ruimtes en via biologische inperking door gebruik te maken van aangepaste microbiële systemen. Aangezien de fantasie bij het verzinnen van mogelijke risico's bij menigeen op hol sloeg, waren de aanvankelijk voorgestelde veiligheidsmaatregelen in retrospect tamelijk draconisch. Zo konden bepaalde, momenteel als onschuldig beoordeelde experimenten alleen in speciaal beveiligde legerlaboratoria worden uitgevoerd. In die tijd begon een aantal vooraanstaande onderzoekscentra beveiligde ruimtes te bouwen om daarmee de toepassing van de recDNA technologie in hun onderzoek mogelijk te maken. De meeste van deze ruimtes zijn nauwelijks gebruikt, omdat de richtlijnen voor onderzoek gaandeweg steeds verder versoepeld werden. Bijna iedereen die bekend is met de technologie is het er momenteel over eens, dat het meeste onderzoek geen of vrijwel geen risico's in zich draagt en dat er dus geen speciale voorzorgen genomen hoeven te worden. Achteraf lijken de discussies in de beginjaren rond deze technologie een boze droom, maar we zijn echt door die fase heengegaan.

Momenteel dienen experimenten, waarbij **in vitro** DNA recombinatie in het spel is in Nederland aangemeld te worden bij de VCOGEM (Voorlopige Commissie Genetische Modificatie). Deze bepaalt vervolgens of er speciale voorzorgen in acht dienen te worden genomen bij het uitvoeren van de proeven. Vaak is dit niet het geval en kan men volstaan met het hanteren van Veilige Microbiologische Technieken (VMT). Hoewel de bureaucratie rond de recDNA technologie op deze manier aanvaardbare proporties heeft aangenomen, is het momenteel toch niet meer goed in te zien waarom dit type onderzoek in een apart hokje geplaatst dient te worden. Ik heb al eerder aangegeven, dat via de klassieke veredeling al veel langer ingegrepen wordt in het erfelijk materiaal van organismen. DNA is in de natuur ook aan veranderingen onderhevig. Bovendien is het zo, dat in de natuur uitwisseling van DNA tussen organismen op grote schaal voorkomt (10). De trend met betrekking tot de regelgeving is evenwel hoopvol. Ik verwacht, dat we zullen toegroeien naar een situatie, waarin de verantwoordelijkheden meer gedecentraliseerd zullen worden. Overkoepelende commissies zouden zich dan bezig kunnen houden met projecten waarin een voorspelbaar risico zit, of die, welke controversiële elementen bevatten.

Maatschappelijke acceptatie van de recDNA technologie

Inmiddels zijn, zoals boven vermeld, de discussies rond **in vitro** DNA recombinatie zover uitgekristalliseerd, dat het meeste wetenschappelijk onderzoek vrijwel probleemloos voortgang kan vinden. Rond produkten, gemaakt met behulp van de

recDNA technologie, is de discussie in de maatschappij evenwel nog volop gaande. Voor de goede orde zij hier nog vermeld, dat dit produkt niet het recombinant DNA molecule is, maar meestal een eiwit, dat met behulp van recDNA technieken gemaakt is. Dit eiwit is vaak identiek aan een natuurlijk voorkomend eiwit, maar alleen op een andere manier gemaakt, men denke aan het eerder genoemde stremselenzym chymosine. Behalve de actieve component bevat het recombinant chymosine nog een aantal bijprodukten ten gevolge van de fermentatie. Het produkt zoals het op de markt komt, wordt uitgebreid op veiligheid getest in toxicologisch onderzoek. Nu zou men denken, dat niets toepassing meer in de weg kan staan. De toepassing blijkt evenwel geen vanzelfsprekendheid getuige het feit, dat de Nederlandse kaasindustrie blijft zweren bij de kalvermagen. De industrie zou het moderne produkt wellicht wel willen gebruiken voor het maken van kazen, maar zij is bang hierdoor economische schade op te lopen. Mijns inziens is er een aantal belangrijke elementen aan te wijzen, waarom de maatschappelijke acceptatie van de recDNA technologie met horten en stoten verloopt:

1. De onderzoekers hebben in het begin zelf aan de bel getrokken en het is dus niet verbazingwekkend, dat het publiek vervolgens de wenkbrauwen frons. Vrijwel alle onderzoekers zijn er inmiddels van overtuigd, dat de recDNA technologie geen bijzondere risico's in zich draagt. In de maatschappij zijn evenwel nog niet alle groepen zover. Voor de voorstanders van de recDNA technologie is een discussie over risico's vaak weinig vruchtbaar omdat niet hard te maken is, dat er geen enkel risico is. Het is theoretisch

onmogelijk te bewijzen dat iets niet kan gebeuren. Wie zal bijvoorbeeld kunnen uitsluiten dat de baby's in de toekomst door ooievaars gebracht gaan worden?

2. De ontwikkelingen zijn zo snel gegaan, dat de maatschappelijke discussies onvoldoende tijd gehad hebben om uit te kristalliseren in een evenwichtig beeld.
3. Het is bijzonder ongelukkig, dat in de discussies een aantal totaal verschillende zaken onder het hoofdstuk biotechnologie wordt gerangschikt. Hierdoor worden zulke uiteenlopende activiteiten als het maken van bier en yoghurt en de constructie van transgene planten en dieren soms op één hoop gegooid.
4. Voor wat een aantal toepassingen betreft, bijvoorbeeld in de voedingsmiddelen sfeer, lijken de voordelen eerder bij de producenten dan bij de consumenten te liggen. Een voordeel voor de producent kan een lagere kostprijs zijn, maar ook een schoner en beter beheersbaar proces. Indien dit type voordelen aan de consumenten zouden worden uitgelegd, zou dit de acceptatie van de nieuwe producten zeker kunnen bevorderen.
5. Het octrooieren van genetisch gemodificeerde levende organismen heeft bij bepaalde groepen weerstanden opgeroepen, mede met het oog op de derde wereld problematiek.

Er zijn ongetwijfeld nog meer punten aan te wijzen, maar ik wil liever nog even stilstaan bij de huidige trends.

Er is in Nederland een aantal studies gedaan naar de maatschappelijke acceptatie van de recDNA technologie (11,12). Hieruit blijkt, dat men in het

algemeen genuanceerd tegen de technologie aankijkt. Er wordt onderscheid gemaakt naar het produkt, dat met de nieuwe techniek gemaakt wordt en de sector waarin het produkt toegepast wordt.

Met name het gebruik van de recDNA technologie ten behoeve van een schoner milieu kan op een brede acceptatie rekenen.

Ook toepassingen op het gebied van de landbouw en medicijnen worden positief onthaald.

Toepassingen op voedingsmiddelengebied en in de diergeneeskunde worden neutraal beoordeeld.

Het minst enthousiast is men voor het gebruik van de recDNA technologie in de veeteelt.

Bij de vorming van attitudes lijken vooral emoties een belangrijke rol te spelen. Volgens de onderzoekers wordt dit mede bepaald door het lage kennisniveau met betrekking tot de biotechnologie en de recDNA technologie. Een goed onderwijs op dit gebied ook op middelbare scholen zal veel kunnen bijdragen aan een wat rationelere oordeelsvorming.

Het is verheugend, dat er in Nederland de laatste tijd een dialoog ontstaat tussen voorstanders en critici van de recDNA technologie. Tot degenen die de ontwikkelingen kritisch volgen reken ik milieu- en consumentenorganisaties en de dierenbescherming. Ze zijn van de voorstanders te onderscheiden doordat ze over genetische manipulatie spreken in plaats van over genetische modificatie. Uit de dialoog tussen deze twee groepen kristalliseert zich wellicht een consensus uit met betrekking tot gewenste en ongewenste toepassingen. Er zijn hiervoor genoeg aanknopingspunten, aangezien zelfs de felste critici van de recDNA technologie stellen dat biotechnologie niet per definitie maatschappelijk ongewenst is (13).

Anderzijds zijn de voorstanders ervan doordrongen

dat naast een technisch-inhoudelijke discussie een maatschappelijke op zijn plaats is, omdat niet alles wat kan ook nodig of gewenst is. Aan het punt van de maatschappelijke acceptatie wordt aandacht besteed in het eerder genoemde college "Industriële toepassingen van genetisch gemodificeerde micro-organismen", dat door de sectie Industriële Microbiologie verzorgd wordt. In dit kader is ook de instelling van een ethische commissie door de Universiteitsraad van de Landbouwniversiteit, die zich bezighoudt met de ethische aspecten van de moderne biotechnologie een goed initiatief.

Ik verwacht dat door deze dialoog de sfeer van polarisatie, die hier en daar rond de recDNA technologie ontstaan is, zal verdwijnen en dat het gezonde verstand zal zegevieren. Indien dit gebeurt zullen de genetische technieken een niet meer weg te denken plaats veroveren in de levensmiddelentechnologie.

Conclusies

Ik heb u in het bovenstaande een beeld geschetst van wat twintig jaar recombinant DNA technologie gebracht heeft met nadruk op toepassingen in de levensmiddelentechnologie. We hebben te maken met een revolutionaire nieuwe technologie, die een grote invloed heeft op het wetenschappelijk onderzoek. Door de recDNA technologie is enorm veel bekend geworden over de organisatie van het erfelijk materiaal in verschillende soorten organismen. Ook heeft zij geleid tot een explosie van de kennis over regulering van cellulaire processen. De kennistoename gaat nog steeds in hoog tempo door. Aanvankelijk vreesde een aantal onderzoekers, dat er grote risico's aan deze technologie verbonden zouden

zijn. Deze vrees is op geen enkele manier bewaarheid. Momenteel zijn de meeste onderzoekers van mening, dat hun onderzoek geen enkel risico voor henzelf of hun omgeving inhoudt. Het aanzwengelen van de discussie over de risico's heeft wel geleid tot een regulering van het recDNA onderzoek. De regels hiervoor zijn in de loop der tijd evenwel steeds verder versoepeld.

Zoals vaak het geval is met nieuwe technologieën heeft ook de recDNA technologie tot maatschappelijke controverses geleid. Het is evenwel te verwachten, dat door een betere voorlichting en een dialoog tussen voor- en tegenstanders een breed gedragen onderzoeks- en toepassingspraktijk zal ontstaan. De commerciële mogelijkheden van de recDNA technologie zijn in een vroeg stadium onderkend, wat inmiddels al geleid heeft tot een groot aantal nieuwe of verbeterde producten die er zonder deze technologie niet geweest zouden zijn.

Toepassing van recDNA producten in de levensmiddelenindustrie komt relatief traag op gang, waarbij het punt van de maatschappelijke acceptatie een rol speelt. Bij het onderzoek in de levensmiddelen-technologie zijn de recDNA technieken reeds een belangrijk hulpmiddel. Dit onderzoek zal leiden tot nieuwe ideeën over producten en tot betere en schonere processen in de levensmiddelenindustrie.

In het bovenstaande heb ik al aangegeven, hoe ik inhoud denk te kunnen geven aan de nieuwe leerstoel "Genetische Technieken in de Levensmiddelen-technologie". Ik hoop vanuit mijn industriële achtergrond nieuwe impulsen aan het onderzoek en onderwijs te geven en zo een bijdrage te leveren aan het instandhouden van de vooraanstaande rol die de

vakgroep internationaal inneemt.

Nawoord

Aan het eind van mijn rede wil ik enkele mensen bedanken die een rol gespeeld hebben bij mijn benoeming.

In de eerste plaats is dat de researchleiding van Gist-brocades die mij in de gelegenheid heeft gesteld deze functie uit te oefenen door mij voor te dragen en mij een dag per week uit te lenen aan de Landbouw-universiteit.

Het College van Bestuur van Landbouwuniversiteit, de Universiteitsraad en de Benoemingsadviescommissie "Genetische Technieken in de Levensmiddelen-technologie" dank ik voor het in mij gestelde vertrouwen.

Hoewel het noemen van namen een riskante zaak is in dezen wil ik speciaal dank zeggen aan Jan de Bont en Wim de Boer voor hun prettige en enthousiaste begeleiding van het hele proces.

De bezetting van deze leerstoel vanuit Gist-brocades zou waarschijnlijk niet of veel moeilijker tot stand zijn gekomen zonder de langdurige en plezierige relatie met de vakgroep Levensmiddelentechnologie. Deze vakgroep vormt een uitstekend voorbeeld van hoe een universitaire groep kan samenwerken met de industrie op basis van eigen specialisatie en interesse, zonder daarbij de eigen belangen uit het zicht te verliezen. Ik zelf heb de laatste jaren de samenwerking met Fons Voragen en medewerkers en de groep van Jaap Visser bijzonder op prijs gesteld.

In de korte tijd, dat ik hier nu weer rondloop ben ik vooral getroffen door het enthousiasme van de studenten en AIO's en de onbekommerdheid waarmee zij de meest moeilijke problemen te lijf gaan. Ik wens hun toe, dat ze dit jeugdig elan nog lang mogen behouden, maar hoop dat ze zo nu en dan een goedbedoeld advies van me zullen opvolgen. Zelf denk ik met veel plezier en zo nu en dan wat lichte heimwee terug aan mijn eigen studententijd hier in Wageningen.

Rest mij nog mijn familie, met name mijn vrouw Marianne, te danken voor de steun bij het uitvoeren van twee deeltijdbanen tegelijk.

Ik dank u voor uw aandacht.

Referenties

1. Watson, J.D. and Tooze, J., 1981, The DNA Story, A documentary history of gene cloning. W.H. Freeman and Co., San Francisco, 605 pp.
2. Cohen, S.N. and Boyer, H.W., 1980, Process for producing biologically functional molecular chimeras. United States Patent 4, 237, 224.
3. Maxam, A.M. and Gilbert, W., 1977, A new method for sequencing DNA Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 560-564.
4. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463-5467.
5. Oliver, S.G. et al., 1991, The complete DNA sequence of yeast chromosome III. Nature 357, 38-46.
6. Maddox, J., 1991, The case for the human genome. Nature 352, 11-14.
7. Das, S. and Hollenberg, C.P., 1982, A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. Current genetics 6, 123-128.
8. Van den Berg, J.A., Van der Laken, K., Van Ooyen, A.J.J., Renniers, A.H.C.M., Rietveld, K., Schaap, A., Brake, A.J., Bishop, R.J., Schultz, K., Moyer, D., Richman, M. and Shuster, J.R., 1990, *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. Bio/technology 8, 135-139.
9. Voragen, A.G.J., 1990, Van grondstof tot levensmiddel: De rol van de chemie. Inaugurele rede Landbouwwuniversiteit Wageningen.

10. Heinemann, J.A., 1991, Genetics of gene transfer between species. *Trends in Genetics* 7, 181-185.
11. Hamstra, A.M., 1991, Publiek weinig enthousiast over biotechnologie aan tafel. *Biotechnologie in Nederland* 1991/1, 19-23.
12. Heijs, W.J.M., Midden, C.H.J. en Drabbe, R.A.J., 1993, *Biotechnologie, houdingen en achtergronden*. Technische Universiteit Eindhoven.
13. Redactioneel commentaar in *Biotekst* 12, 1992, *Studium Generale*; Wageningen.