

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordering en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 19 oktober 2009  
**KENMERK** CGM/091019-01  
**ONDERWERP** Advies: classificatie *Zygosaccharomyces bailii*

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging van vergunning IG 97-126 met de titel 'Eiwitproductie in micro-organismen' van Unilever Research and Development Vlaardingen BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Zygosaccharomyces bailii* in het algemeen en de giststam *Z. bailii* NCYC1427 in het bijzonder. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de mogelijke plaatsing van dit micro-organisme in Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo).

Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau ML-I gewerkt worden.

De aanvrager wil de giststam *Z. bailii* NCYC1427 genetisch modifieren voor de productie van heterologe eiwitten. Hij verzoekt de benodigde clonerings- en expressiewerkzaamheden uit te mogen voeren op ML-I inperkingsniveau.

De gist *Z. bailii* wordt gebruikt bij de productie van de traditionele balsamico-azijn en kent een lange geschiedenis van veilig gebruik. De gistsoort *Z. bailii* is een belangrijke veroorzaker van bederf van vruchtensappen, wijn en ander voedsel. Ondanks het feit dat deze gistsoort algemeen voorkomt, wordt *Z. bailii* niet geassocieerd met enige pathogeniteit voor mens en dier. Tevens zijn er geen aanwijzingen dat deze gistsoort pathogeen is voor planten.

De COGEM adviseert daarom de gistsoort *Z. bailii* in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen en op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen te plaatsen. Gebaseerd op deze indeling is zij van mening dat de voorgenomen clonerings- en expressiewerkzaamheden met *Z. bailii* NCYC1427 op ML-I niveau ingeschaald dienen te worden.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.*

# Classificatie van de gist *Zygosaccharomyces bailii*

## COGEM advies CGM/091019-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren in welke pathogeniteitsklasse de giststam *Zygosaccharomyces bailii* NCYC1427 ingedeeld dient te worden en of dit micro-organisme op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) geplaatst kan worden.<sup>1</sup> De aanvrager wil met deze giststam clonerings- en expressiewerkzaamheden uitvoeren. Tevens is de COGEM verzocht te adviseren over de classificatie van de gistsoort *Z. bailii* in het algemeen.

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.

Bijlage 1 is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen (apathogeen) zijn voor mens, dier of plant. Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.<sup>1</sup> Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

Micro-organismen die op Bijlage 1 vermeld staan, voldoen in ieder geval aan één van de volgende criteria:

- 1) Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- 2) Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- 3) Het micro-organisme behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- 4) Het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij immuuncompetente mensen een ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die een ziekte kunnen veroorzaken bij immungecompromiteerde individuen, worden als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen op Bijlage 1 geplaatst worden.

### ***Zygosaccharomyces bailii***

De schimmelsoort *Z. bailii* is een gist die behoort tot de familie der *Saccharomycetaceae* en is voor het eerst beschreven in 1895 onder de naam *Saccharomyces bailii*. In de daarop volgende jaren is deze gist in de wetenschappelijke literatuur aangeduid met verschillende namen waaronder *Z. manchuricus*, *S. acidifaciens*, *Z. acidifaciens*, *Z. naniwaensis*, *S. elegans* en *S. mestrus*. Pas in 1975 heeft deze ascomycete gist zijn huidige naam, *Z. bailii* gekregen.<sup>2</sup>

Kenmerkend voor *Z. bailii* is zijn uitzonderlijke tolerantie voor conserveringsmiddelen, hoge suiker concentraties, lage pH waarden en pasteurisatie. Door deze eigenschappen heeft *Z. bailii* met name in geconserveerde voedingsmiddelen een groeivoordeel ten opzicht van andere schimmels en bacteriën. Deze gistsoort is betrokken bij het bederf van onder andere ketchup, mayonaise, augurken, marsepein, vruchtensappen, frisdrank en wijn.<sup>2,3</sup> Op onbewerkt fruit wordt *Z. bailii* nauwelijks aangetroffen.

Bij de fermentatie van de traditionele balsamico-azijn spelen *Zygosaccharomyces* soorten, waaronder *Z. bailii* een belangrijke rol.<sup>4</sup> Balsamico-azijn wordt al sinds de middeleeuwen op traditionele wijze geproduceerd en als smaakmaker aan het eten toegevoegd. De Europese Unie heeft de traditionele balsamico-azijn onlangs erkend als product met een beschermde oorsprongsbenaming (protected denomination of origin).<sup>5</sup>

In het laboratorium wordt de gist *Z. bailii* al enige jaren gebruikt als micro-organisme voor de productie van heterologe eiwitten, waaronder  $\beta$ -galactosidase, ascorbinezuur en humaan interleukine 1 $\beta$ .<sup>6,7</sup>

### **Overweging**

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme goed aan te tonen. De afwezigheid van pathogeniteit is echter moeilijk te bewijzen. Daarbij worden gevallen van pathogeniteit gepubliceerd, terwijl er nauwelijks wordt gerapporteerd over de apathogeniteit van micro-organismen. Hierdoor is er van veel bacteriën of schimmels weinig literatuur over pathogeniteit voorhanden. Een lange historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden, dat effecten mogelijk anderszins moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn, en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderszijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden bij de afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik micro-organismen als apathogeen beschouwd.

Onderstaande overweging is gebaseerd op de gegevens uit de literatuur én de inschattingen van (externe) experts.

### ***Zygosaccharomyces bailii***

Sinds de beschrijving van *Z. bailii* in 1895 is er één studie gepubliceerd, waarin het genus *Zygosaccharomyces* in verband wordt gebracht met ziekte bij mensen.<sup>8</sup> In een groep van 200 patiënten met vulvovaginitis werd één patiënt aangetroffen met een *Zygosaccharomyces* soort.

Welke *Zygosaccharomyces* soort het betrof en of deze gist ook daadwerkelijk de vulvovaginitis in desbetreffende patiënt heeft veroorzaakt, is evenwel niet duidelijk.

In de 'Atlas of Clinical Fungi', het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels inclusief vele opportunistische soorten, staat *Z. bailii* niet vermeld.<sup>9</sup> Ook in de wetenschappelijke standaardwerken over gisten wordt *Z. bailii* niet geassocieerd met enige pathogeniteit.<sup>10,11</sup> Persoonlijke communicatie over de komende editie van het standaardwerk 'The Yeast, a taxonomic study', dat in 2010 uitgebracht zal worden, leert dat deze visie op de pathogeniteit van *Z. bailii* in de afgelopen jaren niet is gewijzigd.

De gist *Z. bailii* is voornamelijk betrokken bij het bederf van voedsel en wordt algemeen aangetroffen in bedorven vruchtensappen en wijn. Deze gist wordt gebruikt bij de productie van de traditionele balsamico-azijn en kent hierdoor een zeer lange periode van veilig gebruik. Ondanks het feit dat deze gist wijdverspreid voorkomt en al jarenlang wordt gebruikt in de azijnbereiding heeft de COGEM geen aanwijzingen waaruit blijkt dat *Z. bailii* (opportunistisch) pathogeen is voor mens of dier.

Tevens zijn er geen aanwijzingen gevonden om aan te nemen dat *Z. bailii* als plantpathogeen aangemerkt dient te worden.

De *Z. bailii* stammen die beschikbaar zijn in de 'American Type Culture Collection' worden allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>12</sup> De gistsoort *Z. bailii* wordt ook in de 'Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen' beschouwd als een micro-organisme van pathogeniteitsklasse 1.<sup>13</sup>

Concluderend is de COGEM van mening dat *Z. bailii* als een apathogeen micro-organisme beschouwd moet worden.

### **Advies**

Gezien het niet pathogene karakter van *Z. bailii* adviseert de COGEM om deze gistsoort in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en tevens in Bijlage 1 van de Regeling GGO op te nemen. In de 'National Collection of Yeast Cultures' wordt de giststam *Z. bailii* NCYC1427 als typische vertegenwoordiger beschouwd van de species *Z. bailii*. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen clonerings- en expressiewerkzaamheden met de giststam *Z. bailii* NCYC1427 op inperkingsniveau ML-I in te schalen.

### **Referenties**

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. Thomas DS & Davenport RR (1985). *Zygosaccharomyces bailii* -a profile of characteristics and spoilage activities. *Food microbiol.* **2**:157-169
3. Martorell P *et al.* (2007). Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *Int. J. Food Microbiol.* **114**:234-242

4. Solieri L & Giudici P (2008). Yeasts associated to Traditional Balsamic Vinegar: Ecological and technological features. *Int. J. Food Microbiol.* **125**:36-45
5. European Union (2000). Verordening (EG) nr. 813/2000 van de Raad van 17 april 2000
6. Branduardi P. *et al.* (2004). The yeast *Zygosaccharomyces bailii*: a new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Res.* **4**:493-504.
7. Sauer M *et al.* (2004). Production of L-Ascorbic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:6086-6091
8. Azzam-WM *et al.* (2002). Vulvovaginitis caused by *Candida* spp. and *Trichomonas vaginalis* in sexually active women. *Invest Clin.* **43**:3-13
9. Hoog de GS *et al.* (2009). Atlas of Clinical Fungi. 3<sup>rd</sup> edition
10. Barnett JA *et al.* (2000). Yeasts: characteristics and identification. 3<sup>rd</sup> edition
11. Kurtzman CP & Fell JW (1998). The Yeasts: a taxonomic study. 4<sup>th</sup> edition
12. American Type Culture Collection. Internet: <http://www.lgcstandards-atcc.org/> (08-10-2009)
13. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Internet: [http://www.dsmz.de/microorganisms/yeast\\_catalogue.php?select=Z](http://www.dsmz.de/microorganisms/yeast_catalogue.php?select=Z) (08-10-2009)

*Dit advies is mede tot stand gekomen door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.*