

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 29 oktober 2013
KENMERK CGM/131029-01
ONDERWERP Advies m.b.t. IAB erkenning *Saccharomyces cerevisiae*

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de IAB erkenning van *Saccharomyces cerevisiae* deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd of de soort *Saccharomyces cerevisiae* en de wildtype *S. cerevisiae* stammen RN1026, YD61244 en YD51226 voldoen aan de criteria voor een IAB erkenning. Organismen met een IAB erkenning zijn geschikt voor de vervaardiging van ggo's die gebruikt mogen worden voor grootschalige productie onder dezelfde inperkende omstandigheden als voor wildtype organismen, zonder dat additionele inperkende maatregelen hoeven te worden genomen.

Uit de literatuur blijkt dat *S. cerevisiae* soms bij patiënten wordt aangetroffen. Deze patiënten hebben ernstige immuunstoornissen of één of meerdere factoren die een schimmelinfectie vergemakkelijken zoals een chirurgische ingreep of intraveneuze katheterisatie. De COGEM is van mening dat er geen reden is om aan te nemen dat *S. cerevisiae* ziekteverwekkende eigenschappen bezit en beschouwt *S. cerevisiae* als een opportunistisch pathogeen.

S. cerevisiae wordt al duizenden jaren door de mens gebruikt om brood, wijn en bier te produceren en kent een historie van veilig gebruik.

Gezien het bovenstaande concludeert de COGEM dat de soort *S. cerevisiae* voldoet aan de criteria voor een IAB erkenning. *S. cerevisiae* kan gebruikt worden voor de vervaardiging van ggo's waarmee op MI-I inperkingsniveau gewerkt kan worden.



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

Hoogachtend,

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Dit advies is mede tot stand gekomen met inbreng van dr. T. Boekhout van het Centraalbureau voor Schimmelcultures

Advies m.b.t. IAB erkenning van *Saccharomyces cerevisiae*

COGEM advies CGM/131029-01

1. Inleiding

De COGEM is in verband met een toekomstige vergunningaanvraag voor grootschalige productie met genetische gemodificeerde (gg-) *Saccharomyces cerevisiae* stammen gevraagd of de wildtype *S. cerevisiae* stammen RN1026 (= ATCC96581), YD61244 (= CCUG53310, = DS71254) en YD51226 (= NCYC51226, = DS70797) voldoen aan de criteria voor een IAB erkenning. De stammen zullen gebruikt gaan worden voor de vervaardiging van gg-*S. cerevisiae* stammen waar in de toekomst een IAB erkenning voor aangevraagd zal worden. Daarnaast is de COGEM gevraagd of de soort *S. cerevisiae* in zijn geheel voldoet aan de criteria voor een IAB erkenning.

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae (beter bekend als bakkersgist) is een ascomycete schimmel en was de eerste eukaryoot waarvan het volledige genoom gesequenced werd. *S. cerevisiae* kent zowel een haploïde als een diploïde vorm. Het chromosomale DNA bevat in de haploïde vorm zestien chromosomen (12.068 kb) met zo'n 5.885 eiwitcoderende genen.¹

S. cerevisiae plant zich zowel in de haploïde als de diploïde vorm voort door zich te delen.² Dit asexuele stadium is ook bekend onder de naam *Candida robusta*.³ *S. cerevisiae* kan zich daarnaast sexueel voortplanten. Haploïde cellen van verschillende mating-typen (a en alpha) fuseren en vormen een diploïde cel.² Wanneer er een tekort aan bepaalde voedingsstoffen ontstaat, kunnen de diploïde cellen gaan sporuleren. Hierbij worden haploïde cellen (ascosporen) gevormd die bestand zijn tegen omstandigheden die aangetroffen worden in het darmstelsel van insecten.⁴ Op grond hiervan wordt gespeculeerd dat de vorming van ascosporen bijdraagt aan de verspreiding van *S. cerevisiae* door insecten.⁴ Bij gunstige omstandigheden kunnen de ascosporen kiemen en zich asexueel voortplanten.⁵ De mate waarin een *S. cerevisiae* stam sporuleert varieert van niet tot volledig sporulerend.²

S. cerevisiae wordt al duizenden jaren door de mens gebruikt voor de productie van brood, bier en wijn. In wijnkruiken uit het oude Egypte, die gedateerd werden op 3.150 jaar voor de start van de jaartelling, werd *Saccharomyces cerevisiae* aangetroffen.⁶ Recenter is het gebruik van *S. cerevisiae* voor de productie van biobrandstoffen, wasmiddelen en medicijnen.⁵

Naast de gedomesticeerde *S. cerevisiae* stammen die bij de voedselproductie worden gebruikt zijn er ook wilde stammen geïsoleerd van paddenstoelen en fruit, uit de bodem en uit het maagdarmkanaal van kevers.⁶

Om besmetting met andere gisten te voorkomen worden tegenwoordig onder andere in de start cultures voor de productie van wijn *S. cerevisiae* stammen gebruikt die zogenaamde 'killer' toxinen produceren.⁷ Bij 88% van de wijnmakerijen werden dergelijke stammen in het fermentatie proces aangetroffen.⁷ Ook worden bewust stammen geconstrueerd die 'killer' toxinen produceren.⁸ De

activiteit van deze 'killer' toxinen is voornamelijk gericht tegen gisten die nauw verwant zijn aan de productiestam (*S. cerevisiae*). In sommige gevallen kunnen andere verwante ascomycete gisten gedood worden. Sommige *S. cerevisiae* stammen afkomstig uit wijnmakerijen doodden *Candida glabrata*.⁹ De 'killer' toxinen zijn niet actief tegen bacteriën.^{10,11}

'Killer' toxinen worden gecodeerd door extra-chromosomale elementen in de vorm van dsRNA of ds lineair DNA, of door het chromosomale DNA. Bij celfusie of celdeling kan de eigenschap worden overgedragen.^{7,9}

Uit de literatuur blijkt dat *S. cerevisiae* infecties bij de mens voorkomen. Gerapporteerde infecties variëren van huidinfecties, vaginitis tot infecties van de bloedbaan en vitale organen en werden gerapporteerd bij zowel immuungecompromitteerde als immuuncompetente individuen.⁶ *S. cerevisiae* var. *boulardii*, dat gebruikt wordt als probioticum voor de behandeling van verschillende vormen van diarree¹² was in 40% van de gevallen verantwoordelijk voor de beschreven infecties en werd vaker aangetroffen in immuuncompetente patiënten.¹³ De immuuncompetente patiënten waarbij invasieve *S. cerevisiae* infecties werden gerapporteerd hadden één of meerdere factoren die een schimmelinfectie vergemakkelijken zoals een chirurgische ingreep of intraveneuze katheterisatie.¹³

2. Adviesvraag

De COGEM is gevraagd of de stammen RN1026 (=ATCC96581), YD61244 (= CCUG53310, = DS71254) en YD51226 (= NCYC51226, = DS70797) voldoen aan de criteria voor een IAB erkenning. Deze wildtype stammen zijn geïsoleerd uit fabrieken waar op industriële schaal ethanol wordt geproduceerd uit grondstoffen als 'sulfite spent liquor' (afkomstig uit de houtpulpindustrie) of suikermelasse (afkomstig uit de suikerindustrie).

Bij de productie van ethanol worden deze grondstoffen gehydrolyseerd, waarbij hexose en pentose suikers worden gevormd. Hexosen en pentosen kunnen door verschillende micro-organismen in ethanol worden omgezet. Bij de hydrolyse worden echter ook stoffen gevormd die de groei van de meeste micro-organismen remmen, waardoor de fermentatie kan stoppen. Sommige *S. cerevisiae* stammen blijven ook in aanwezigheid van deze remmende stoffen ethanol produceren.

S. cerevisiae stam YD61244 (=CCUG53310) is geïsoleerd uit een ethanolfabriek (Domsjö Fabriker AB, Örnskö, Zweden). Deze stam produceert ethanol in aanwezigheid van bepaalde stoffen ('carboxylic acids' en 'furan aldehydes') die bij hydrolyse van lignocellulose worden gevormd en andere micro-organismen remmen.¹⁴ Ook *S. cerevisiae* stam RN1026 (=ATCC96851) is tolerant voor bij hydrolyse gevormde remmende stoffen.¹⁵ Deze stam is geïsoleerd uit een papierpulpfabriek.¹⁶

Volgens de aanvrager is *S. cerevisiae* stam YD51226 (=NCYC51226) geïsoleerd uit een Braziliaanse ethanolfabriek. Er is echter geen literatuur aangeleverd waarmee de herkomst van deze stam geverifieerd kan worden.

De aanvrager wil deze wildtype stammen gebruiken voor de ontwikkeling van gg-stammen die biobrandstof uit houtachtige bewerkte biomassa kunnen produceren.

3. Inrichtingsvoorschriften procesinstallaties

Grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de Regeling ggo.¹⁷ Binnen een MI-I inperking stelt de Regeling dat het fysisch inperkende systeem moet voldoen aan de eisen die voor het ouderorganisme gelden in procesinstallaties. Daarnaast geldt dat de werkvoorschriften gevolgd worden die gebruikelijk zijn voor activiteiten met het ouderorganisme in procesinstallaties.

Op MI-I inperkingsniveau worden uitsluitend organismen gehanteerd die voldoen aan de IAB criteria.^{17,18} Volgens deze criteria moeten de organismen niet-pathogeen zijn, een veilige vector en ongevaarlijke sequenties bevatten. Na afloop van de werkzaamheden hoeven deze ggo's niet eerst afgedood te worden voordat zij worden geloosd, omdat IAB organismen geen risico vormen voor mens en milieu.

Op MI-II inperking of hoger worden organismen gehanteerd die geen IAB erkenning hebben. In deze ruimten moet het fysisch inperkende systeem zo geconstrueerd zijn dat de verspreiding van de ggo's wordt beperkt. Tevens moeten de ggo's na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd alvorens de inhoud van het fysisch inperkende systeem geloosd mag worden.

4. Pathogeniteitsclassificatie

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 van de regeling ggo 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.¹⁷ 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.

- Het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- Het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- 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.
- 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 mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem, worden in de regel als niet pathogeen (apathogeen) beschouwd en kunnen derhalve op Bijlage 1 geplaatst worden.

5. Eerdere COGEM adviezen

In 2011 heeft de COGEM op verzoek van het ministerie de classificatie van micro-organismen herzien. Hiertoe heeft zij een onderzoek laten uitvoeren door dr. T. Boekhout van het Centraalbureau voor Schimmelcultures.¹⁹ De COGEM heeft naar aanleiding van dit onderzoeksrapport adviezen uitgebracht over de classificatie van apathogene en pathogene schimmels.^{20,21} De COGEM heeft *S. cerevisiae* opgenomen in de lijst met apathogene schimmels die op Bijlage 1 geplaatst kunnen worden.²⁰ Er zijn verschillende *S. cerevisiae* stammen met een IAB erkenning.¹⁷

6. Overweging

S. cerevisiae wordt al duizenden jaren door de mens gebruikt voor de productie van brood, bier en wijn en kent een historie van veilig gebruik.

Uit de literatuur blijkt dat *S. cerevisiae* soms bij patiënten wordt aangetroffen. Deze patiënten hebben ernstige immuunstoornissen of één of meerdere factoren die een schimmelinfectie vergemakkelijken zoals een chirurgische ingreep of intraveneuze katheterisatie. De COGEM is op basis van de beschreven gevallen van mening dat er geen reden is om aan te nemen dat *S. cerevisiae* ziekteverwekkende eigenschappen bezit en beschouwt *S. cerevisiae* als een opportunistisch pathogeen.

Sommige *S. cerevisiae* stammen produceren zogenaamde 'killer' toxinen. Deze toxinen zijn gericht tegen andere *S. cerevisiae* stammen, maar kunnen ook sommige andere verwante ascomycete gisten doden. Stammen die 'killer' toxinen produceren worden ondermeer ingezet bij de productie van wijn om besmetting met andere nauw verwante gisten te voorkomen. De COGEM kent geen publicaties waarbij het grootschalige gebruik van deze stammen heeft geleid tot schade voor mens en milieu.

De *S. cerevisiae* stammen RN1026 (= ATCC96581), YD61244 (= CCUG53310, = DS71254) en YD51226 (= NCYC51226, = DS70797) zijn geïsoleerd uit ethanol- of papierpulpfabrieken. In dergelijke fabrieken wordt zonder inperkende maatregelen gewerkt. Er is op grond van de door de aanvrager uitgevoerde experimenten geen reden om aan te nemen dat de *S. cerevisiae* stammen de in grond en water aanwezige microflora kunnen verdringen.

Gezien het bovenstaande acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van grootschalige productieactiviteiten met de soort *S. cerevisiae* en de *S. cerevisiae* stammen RN1026 (= ATCC96581), YD61244 (= CCUG53310, = DS71254) en YD51226 (= NCYC51226, = DS70797) op MI-I inperkingsniveau verwaarloosbaar klein.

7. Advies

Concluderend is de COGEM van mening dat de soort *S. cerevisiae* en de *S. cerevisiae* stammen RN1026 (= ATCC96581), YD61244 (= CCUG53310, = DS71254) en YD51226 (= NCYC51226, = DS70797) geschikt zijn als gastheerorganisme voor de vervaardiging van ggo's waarmee zogenaamde grootschalige handelingen (categorie B) kunnen worden uitgevoerd (IAB erkenning).

Referenties

1. Goffeau A *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274 (5287): 546, 563-567
2. Sherman F (1998). An introduction to the genetics and molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. www.urmc.rochester.edu/labs/Sherman-Lab/publications/pdfs/Saccharomyces-Cerevisiae-Yeast-Intro.pdf (21 oktober 2013)
modified from F. Sherman, *Yeast genetics. The encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*. pp. 302-325, Vol. 6. Edited by R.A. Meyers, VCH Publisher, Weinheim, Germany, 1997
3. Arendrup MC *et al.* (2013). ESCMID/ECMM Joint clinical guideline for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbial Infect.* doi: 10.1111/1469-0691.12360
4. Neiman AM (2011). Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 189: 737-765
5. *Saccharomyces* genome database Wiki. http://wiki.yeastgenome.org/index.php/What_are_yeast%3F (21 oktober 2013)
6. Diezmann S & Dietrich FS (2009). *Saccharomyces cerevisiae*: population divergence and resistance to oxidative stress in clinical, domesticated and wild isolates. *PLoS One*. 4(4): e5317. doi:10.1371/journal.pone.0005317
7. Magliani W *et al.* (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*. 10(3): 369-400
8. Bajaj BK & Sharma S (2010). Construction of killer industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* HAU-1 and its fermentation performance. *Braz J Microbiol*. 41(2): 477-485
9. Sangorrín MP *et al.* (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *Int J Food Microbiol*. 119: 351-357
10. Hatoum R, Labrie S & Fliss I (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2012.00421
11. Pfeiffer P *et al.* (1988). Effect of a killer toxin of yeast on eukaryotic systems. *Appl Environ Microbiol*. 54(4): 1068-1069
12. Waarvoor Boulardii gebruiken? <http://boulardii.nl/waarvoor-boulardii-gebruiken/> (25 oktober 2013)
13. Enache-Angoulvant A & Hennequin C (2005). Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clin Infect Dis*. 41: 1559-1568

14. Westman JO, Taherzadeh MJ & Franzén CJ (2012). Inhibitor tolerance and flocculation of a yeast strain suitable for second generation bioethanol production. *Electron J Biotechnol*. doi: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-8
15. Brandberg T *et al.* (2005). Continuous fermentation of undetoxified dilute acid lignocellulose hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC96581 using cell recirculation. *Biotechnol Prog*. 21: 1093-1101
16. Lindén T, Peetre J & Hahn-Hägerdal B (1992). Isolation and characterization of acetic-acid tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl Environ Microbiol*. 58(5):1661-1669
17. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20regelgeving/Regeling-genetisch-gemodificeerde-organismen.pdf> (21 oktober 2013)
18. EVO criteria. <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/EVO%20criteria.pdf> (16 oktober 2013)
19. Boekhout (2011). Classificatie humaan- en dierpathogene fungi. Onderzoeksrapport CGM 2011-08
20. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. Advies CGM/111024-02
21. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. Advies CGM/111024-03