

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 18 februari 2014
KENMERK CGM/140218-01
ONDERWERP Advies Classificatie van vijf *Saccharomyces* soorten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een verzoek tot wijziging van vergunning IG 02-023 met de titel 'Expressie van homologe en heterologe genen in gist' van de Technische Universiteit Delft, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd om de soorten *Saccharomyces kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus* te classificeren. Daarnaast is gevraagd werkzaamheden met deze gistsoorten in de delen. De aanvrager wil deze gistsoorten genetisch modificeren ten behoeve van de productie van eiwitten of metaboliëten.

S. cerevisiae, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. eubayanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* en de hybride soort *S. pastorianus* behoren tot de *Saccharomyces sensu stricto* groep. De gistsoorten binnen deze groep kunnen onderling hybriden vormen. Een aantal van deze gistsoorten wordt gebruikt bij de productie van bier en wijn.

S. kudriavzevii, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus* zijn nog nooit in verband gebracht met ziekteverwekkende eigenschappen bij mens, dier of plant.

De COGEM adviseert deze gistsoorten in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) in te delen en op Bijlage 1 te plaatsen. Tevens is zij van mening dat de voorgenomen kloneringswerkzaamheden met deze gistsoorten op ML-I niveau ingeschaald moeten worden.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
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 door de inbreng van Dr. T. Boekhout werkzaam bij het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.

Classificatie van vijf *Saccharomyces* soorten

COGEM advies CGM/140218-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de gistsoorten *Saccharomyces kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus*. Tevens is de COGEM gevraagd kloneringswerkzaamheden met deze gistsoorten in te schalen. De adviesvraag heeft betrekking op de aanvraag tot wijziging van de vergunning 'Expressie van homologe en heterologe genen in gist' (IG 02-023) van de Technische Universiteit Delft.

De aanvrager is voornemens om kloneringswerkzaamheden met deze gistsoorten uit te voeren ten behoeve van de productie van eiwitten of metabolieten. De aanvrager stelt voor om de genoemde gistsoorten in te schalen in pathogeniteitsklasse 1 en op Bijlage 1 van de Regeling ggo te plaatsen, zodat werkzaamheden met deze gistsoorten op ML-I inperkingsniveau kunnen plaatsvinden.

Pathogeniteitsclassificatie

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

Volgens de Regeling ggo is een indeling in pathogeniteitsklasse 1 van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het 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.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.¹

Bijlage 1 Regeling ggo

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant (pathogeniteitsklasse 1). 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.¹ Voorbeelden van potentieel ‘gevaarlijke’ inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren, virale en cellulaire oncogenen, en genen waarvan de expressie leidt tot verstoring van de ecologische balans in de darmflora.

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 beschouwd en kunnen, als aan een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

Saccharomyces sensu stricto

S. cerevisiae, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. bayanus*, *S. eubayanus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae* en *S. kudriavzevii* behoren tot de *Saccharomyces sensu stricto* groep.^{2,3} Het genus *Saccharomyces* behoort binnen het phylum *Ascomycota* tot de orde van de *Saccharomycetales* en de familie van de *Saccharomycetaceae*. Species binnen dit genus bevatten in de haploïde vorm zestien chromosomen en varieert in lengte binnen de *S. sensu stricto* groep van 11.6 tot 12.1 Mb.³

Deze gistsoorten vermeerderen zich, zowel in haploïde als de diploïde vorm, door te delen.⁴ Daarnaast kunnen deze gistsoorten zich ook sexueel voortplanten en sporen vormen. Haploïde cellen van verschillende mating-typen (a en alpha) kunnen fuseren en een diploïde cel vormen. Cellen van verschillende soorten binnen de *S. sensu stricto* groep kunnen met elkaar fuseren waardoor hybride soorten kunnen ontstaan.^{5,6}

S. paradoxus is nauw verwant aan *S. cerevisiae* en is in Rusland, Oezbekistan en Azerbeidzjan geïsoleerd uit het exsudaat van eikenbomen (*Quercus* sp.). *S. paradoxus* is in de Verenigde Staten geïsoleerd uit fruitvliegen (*Drosophila pseudoobscura*), in Denemarken uit heidegrond en in Portugal, Duitsland en Canada uit boomschors.^{7,8} *S. paradoxus* kan groeien bij 37° Celcius, maar 30° Celcius lijkt de optimale groeitemperatuur te zijn.⁹

S. mikatae is geïsoleerd uit rottend blad en aarde in Japan.⁷ In 2013 is een hybride geproduceerd met *S. cerevisiae* die gebruikt kan worden voor de productie van wijn op commerciële schaal.¹⁰ *S. kudriavzevii* is geïsoleerd uit rottend blad in Japan, van eikenschors en de schors van de tamme kastanje (*Quercus faginea*, *Q. ilex*, *Q. purenaica* en *Castanea sativa*) in Portugal.^{7,8} De analyse van bier in verschillende landen tijdens het brouwproces leverde een aantal hybriden op van *S. cerevisiae* en *S. kudriavzevii*.¹¹ In 2011 is *S. eubayanus* geïsoleerd uit de bast van de *Nothofagus* (Zuidelijke beuk) uit de bossen van Patagonië. *S. pastorianus* is ontstaan door hybridisatie van *S. eubayanus* en *S. cerevisiae* (bakkersgist).⁵ *S. pastorianus* (voorheen *Saccharomyces carlsbergensis*) wordt sinds de 15^e eeuw gebruikt bij het brouwen van pils.¹² Behalve voor *S. pastorianus* is *S. eubayanus* ook beschreven als ouderorganisme van *S. bayanus*.¹³ *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* en *S. pastorianus* kunnen niet groeien bij 37° Celcius.¹⁴ Van *S. eubayanus* is niet bekend of het bij 37° Celcius kan groeien. Van geen van de genoemde soorten zijn pathogene stammen bekend.

Eerdere COGEM adviezen en classificaties

In 2011 heeft de COGEM op verzoek van het Ministerie van IenM de classificatie van micro-organismen herzien. Hiertoe heeft zij een onderzoek laten uitvoeren door dr. T. Boekhout van het Centraal Bureau voor Schimmelcultures.¹⁵ De COGEM heeft naar aanleiding van dit onderzoeksrapport adviezen uitgebracht over de classificatie van apathogene en pathogene schimmels.^{16,17} *S. cerevisiae*, *S. bayanus* en *S. uvarum*, die tot de *Saccharomyces sensu stricto* groep behoren, zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Onlangs heeft de COGEM geadviseerd dat *S. cerevisiae* voldoet aan de criteria voor een IAB erkenning voor grootschalige productie en dat *S. cerevisiae* gebruikt kan worden voor de vervaardiging van ggo's waarmee op MI-I inperkingsniveau gewerkt kan worden.¹⁸

S. kudriavzevii, *S. mikatae* en *S. paradoxus* worden door de 'American Type Culture Collection' (ATCC) beschouwd als micro-organismen vallend onder het laagste veiligheidsniveau (biosafety level 1).

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 van veel micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange gedocumenteerde 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 moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

Verschillende *Saccharomyces* spp. worden al eeuwen gebruikt voor de productie van brood, bier en wijn. *S. pastorianus* wordt gebruikt voor de productie bier en kent een historie van veilig gebruik. Behalve voor *S. pastorianus* is *S. eubayanus* ook een ouderorganisme van *S. bayanus*, die eerder is opgenomen op Bijlage 1. Er zijn bij de COGEM geen aanwijzingen dat *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus* pathogeen zijn voor mens, dier of plant.

Concluderend is de COGEM van mening dat *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus* als apathogene micro-organismen moeten worden beschouwd.

Advies

Gezien het niet pathogene karakter van *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus* en *S. eubayanus* adviseert de COGEM om deze gistsoorten in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Aansluitend adviseert de COGEM de voorgenomen kloneringswerkzaamheden met deze gistsoorten in te schalen op ML-I inperkingsniveau.

Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
2. Replansky T *et al.* (2008). *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends Ecol Evol.* 23(9):494-501. doi: 10.1016/j.tree.2008.05.005. Epub 2008 Jul 24
3. Scannell DR *et al.* (2011). The Awesome Power of Yeast Evolutionary Genetics: New Genome Sequences and Strain Resources for the *Saccharomyces sensu stricto* Genus. G3 (Bethesda) 1:11-25
4. 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
5. Libkind DH *et al.* (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(35):14539-44
6. Sipiczki M (2008). Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* 8(7):996-1007
7. Naumov GI *et al.* (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50 Pt 5:1931-42
8. Sampaio JP & Gonçalves P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol.* 74(7):2144-52
9. Sweeney JY *et al.* (2004). Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast Res.* 4(4-5):521-5
10. Bellon JR *et al.* (2013). Introducing a new breed of wine yeast: interspecific hybridisation between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS One.* 17;8(4):e62053. doi: 10.1371/journal.pone.0062053
11. González SS *et al.* (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl Environ Microbiol.* 74(8):2314-20. doi: 10.1128/AEM.01867-07. Epub 2008 Feb 22
12. Casaregola S *et al.* (2001). Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(Pt 4):1607-18.
13. Pengelly RJ & Wheals AE (2013). Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. *FEMS Yeast Res.* 13(2):156-61
14. Kurtzman CP *et al.* (2011). *The Yeasts, a taxonomic study*, 5th edition
15. Boekhout T (2011). Classificatie humaan- en dierpathogene fungi. Onderzoeksrapport CGM 2011-08
16. COGEM (2011). Classificatie apathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-02
17. COGEM (2011). Classificatie pathogene schimmels. COGEM advies CGM/111024-03
18. COGEM (2013). Advies m.b.t. IAB erkenning *Saccharomyces cerevisiae*. COGEM advies CGM/131029-01