

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 26 mei 2021
KENMERK CGM/210526-01
ONDERWERP Advies pathogeniteitsclassificatie gistsoort *Pichia kluyveri*

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Vrije Universiteit om de gistsoort *Pichia kluyveri* op Bijlage 2, lijst A1 (apathogene organismen) van de Regeling ggo te plaatsen (IG 21-087_2.13-000), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de gistsoort *Pichia kluyveri* en de plaatsing van deze gist op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

P. kluyveri komt wijdverspreid voor in de natuur en kan aanwezig zijn in rottend fruit en bij natuurlijke fermentatie van landbouwproducten, zoals koffiebonen. Naar *P. kluyveri* wordt veel onderzoek gedaan voor de productie van gefermenteerde levensmiddelen zoals wijn en bier. Tevens is de gistsoort commercieel verkrijgbaar voor productie van non- of laagalcoholische dranken. Daarnaast kan *P. kluyveri* door het uitscheiden van toxines en organische vluchtige stoffen bepaalde gisten (en andere schimmels) doden. Door deze anti-microbiële eigenschap wordt onderzoek gedaan naar *P. kluyveri* als potentieel middel tegen voedselbederf. Er zijn geen publicaties bekend die *P. kluyveri* in verband brengen met pathogeniteit voor plant, mens of dier.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM om *P. kluyveri* in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en op te nemen in bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.



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. - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's, DG
 Milieu en Internationaal

Pathogeniteitsclassificatie van de gistsoort *Pichia kluyveri*

COGEM advies CGM/210526-01

1. Inleiding

Naar aanleiding van een verzoek van de Stichting Vrije Universiteit, is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de gistsoort *Pichia kluyveri* (IG 21-087) en de plaatsing van deze soort op Bijlage 2, lijst A1 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen' (Regeling ggo).¹ Deze bijlage bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname op Bijlage 2, lijst A1 betekent dat onder ML-I laboratoriumcondities met het betreffende micro-organisme ggo's vervaardigd mogen worden indien hierbij vectoren worden gebruikt die wél, of inserties die níet, op de A-lijsten staan (lijst A2 veilige vectoren en lijst A3 inserties).

2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo 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. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

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

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo geplaatst worden.

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

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

3. Taxonomie gisten

Gisten behoren tot het rijk van de schimmels (Fungi). Gisten planten zich doorgaans ongeslachtelijk voort en zijn in het giststadium ééncellig. Sommige gistsoorten kunnen zich onder bepaalde omstandigheden ook geslachtelijk via asco- of basidiosporen voortplanten. Omdat de geslachtelijke (teleomorfe) en ongeslachtelijke (anamorfe) stadia er verschillend uitzien, hebben deze gisten in het verleden verschillende soortnamen gekregen. In 2011 is door het ‘International Botanical Congress’ besloten dat het tot dan toe gebruikelijke duale nomenclatuursysteem van schimmels zou komen te vervallen en dat vanaf januari 2013 een schimmel slechts één naam mag hebben.² Het nomenclatuursysteem van schimmels wordt nog met regelmaat aangepast tijdens ‘Fungal Nomenclature Sessions’ van het ‘International Botanical Congress’.³

Gisten werden tevens in het verleden niet enkel op basis van morfologie (van seksuele en de asexuele stadia) maar ook op fysiologische kenmerken (fermentatie- en groeitesten) in genera ingedeeld. De toenemende informatie over genoomsequenties laat zien dat overeenkomsten in deze kenmerken geen correcte voorstelling geven van de genetische verwantschap van gisten, waardoor de taxonomie aan verandering onderhevig is.

4. *Pichia kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev (1960)

Pichia kluyveri (synoniem *Hansenula kluyveri*) behoort tot het genus *Pichia*, dat twintig geaccepteerde soorten bevat met *Pichia membranifaciens* als typesoort, en behoort tot de familie *Saccharomycetaceae*.⁴ In de jaren 80 zijn twee nieuwe varianten van *P. kluyveri* geïdentificeerd, *P. kluyveri* var. *cephalocereana* en *P. kluyveri* var. *eremophila*,⁵ maar deze zijn later op basis van genetische analyses als aparte soorten (*Pichia cephalocereana* en *Pichia eremophila*) ingedeeld.⁶ *P. kluyveri* komt wijdverspreid voor in de natuur en wordt vaak geïsoleerd uit rottend fruit en kan worden aangetroffen bij natuurlijke fermentatie van andere landbouwproducten, zoals koffiebonen.^{4,5} Ook is *P. kluyveri* geïsoleerd uit fruitvliegen (*Drosophila melanogaster*) die in een wijnkelder aangetroffen werden.⁷

P. kluyveri kan zich asexueel voortplanten door middel van multilaterale knopvorming (‘budding’ vanuit verschillende locaties op de gistcel). Ook kan de gist seksueel reproduceren door het vormen van asci (sporenzakjes), die elk één tot vier (in zeldzame gevallen vijf tot acht) hoedvormige ascosporen bevatten.^{8,9} De gistcel zelf is bol- tot eivormig (2-10 µm) en vormt soms pseudohyfen (pseudoschimmeldraden) die ontstaan wanneer cellen aan elkaar vast blijven zitten na ‘budding’. De meeste *P. kluyveri* stammen zijn heterothallisch (waarbij twee compatibele partners nodig zijn om

sporen te vormen), maar in sommige gevallen kan ook zelf-sporulatie plaatsvinden.⁴ De fenotypische karakteristieken van *P. kluyveri* vertonen veel gelijkenis met die van de bekende gistsoort *Saccharomyces cerevisiae*, maar de gist kan onderscheiden worden van *S. cerevisiae* door de productie van biofilm in most (vruchtensap voorafgaand aan het gisten).⁹

P. kluyveri kan groeien bij temperaturen tussen de 19 en 37°C, alhoewel voor sommige stammen groei niet altijd mogelijk is bij 37°C.^{4,8} Deze gist kan glucose fermenteren, maar geen andere suikers.⁴ Door fermentatie van glucose wordt ethanol geproduceerd, maar *P. kluyveri* wordt gekenmerkt door een lagere alcoholopbrengst dan *S. cerevisiae*, omdat laatstgenoemde meerdere suikers kan fermenteren.⁹ Niet alle glucose wordt omgezet naar ethanol, ook worden andere componenten zoals glycerolen en zuren geproduceerd.¹⁰ *P. kluyveri* produceert daarnaast ook aromatische componenten zoals (fruitige en florale) esters en thiolen.⁹ Er is veel onderzoek gedaan naar het gebruik van *P. kluyveri* bij de productie van (laag)alcoholische dranken,^{9,11,12,13,14,15} en er zijn enkele studies uitgevoerd naar de verbetering van smaak van koffie en cacao door fermentatie met *P. kluyveri*.^{16,17,18} Tevens wordt een specifieke stam van *P. kluyveri* (sequentieel gecombineerd met *S. cerevisiae*) verkocht als product voor de bereiding van laag- of non-alcoholische dranken door bier- en wijnmakers.^{19,20,21}

Naast het gebruik van *P. kluyveri* bij de bereiding van (non-)alcoholische dranken, wordt er ook onderzoek verricht naar de antimicrobiële eigenschappen van deze gist.^{9,22,23} *P. kluyveri* wordt beschouwd als een zogenaamde ‘killer yeast’ vanwege de productie van ‘killer’ toxines (ook wel ‘mycocins’). Deze ‘killer’ toxines worden geproduceerd door verscheidene gisten (er zijn meer dan 11 verschillende ‘killer’ toxines beschreven uit bijna 100 gistsoorten afkomstig uit meer dan twintig verschillende genera), waaronder *S. cerevisiae*.²⁴ Voor *P. kluyveri* zijn twee killer toxines beschreven, een toxine van 19 kDa geproduceerd door de *P. kluyveri* stam 1002,²⁵ en Pkkp (54 kDa) geproduceerd door *P. kluyveri* stam DBVPG 5826.²² Het toxine geproduceerd door *P. kluyveri* stam 1002 vormt ion-kanalen in het membraan van gevoelige cellen en is dodelijk voor gisten uit de genera *Candida*, *Saccharomyces* en *Torulopsis*.^{25,26} De werking van dit toxine is vergelijkbaar met de K1 toxine activiteit van *S. cerevisiae*, dat eveneens de functie van het celmembraan van de cellen waar het toxine aan bindt, verstoort.^{26,27} Het Pkkp toxine is effectief gebleken in het doden van andere gistsoorten die betroffen zijn bij voedselbederf, waaronder *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* en ook *S. cerevisiae*.²² De exacte werking van dit toxine is niet geheel bekend. Ook kan door de productie van vluchtige organische verbindingen door *P. kluyveri* antimicrobiële activiteit bereikt worden tegen gisten en andere schimmels vanwege groeiremmende eigenschappen.²³ Vanwege de antimicrobiële activiteit wordt ook wel onderzoek gedaan naar *P. kluyveri* als niet-chemische component om voedselbederf te voorkomen.²²

5. Eerder COGEM advies en internationale classificaties

De COGEM heeft in 2018 een lijst met de pathogeniteit van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels geactualiseerd en gepubliceerd.²⁸ Zij heeft hierin meerdere soorten uit het

genus *Pichia* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Een enkele soort, *Pichia kudriavzevii* heeft zij ingedeeld als dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2.

De buitenlandse instantie ‘American Type Culture Collection’ (ATCC) heeft verscheidene *P. kluyveri* stammen ingedeeld op het laagste veiligheidsniveau (‘Biosafety level 1’).²⁹ Deze classificatie van de ATCC is gebaseerd op pathogeniteit voor de mens. De inschaling door deze buitenlandse instantie geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

6. Overweging en advies

Wetenschappelijk gezien is de pathogeniteit van een micro-organisme in het algemeen 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.

Voor zover bij de COGEM bekend, zijn er geen publicaties waarin melding wordt gemaakt dat *P. kluyveri* pathogeen is voor mens, dier of plant. Bekend is dat sommige stammen van *P. kluyveri* antimicrobiële eigenschappen hebben en zogenaamde ‘killer’ toxines kunnen produceren, waar met name onderzoek naar gedaan wordt met betrekking tot het voorkomen van voedselbederf. Productie van killer toxines in gisten met antimicrobiële eigenschappen is een bekend fenomeen en komt ook voor bij de (apathogene) bier- of bakkersgist *S. cerevisiae*.

Naar *P. kluyveri* wordt voornamelijk onderzoek gedaan met betrekking tot de bereiding van alcoholische dranken. Ook wordt de gist commercieel aangeboden voor de productie van non- of laagalcoholische dranken. Er zijn geen gevallen in de literatuur bekend van toxische of nadelige effecten van *P. kluyveri* bij de mens of bij dieren. In de ‘Atlas of Clinical Fungi’, het naslagwerk met alle klinisch relevante schimmels, staat *P. kluyveri* ook niet vermeld als pathogene schimmel/gist.³⁰ Verder staat de gist niet vermeld als plantpathogeen in verscheidene ‘online databases’ met informatie over schimmelsoorten die ziekten bij planten veroorzaken.^{31,32,33,34}

Het voorgaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat *P. kluyveri* niet pathogeen is voor mens, dier en plant. Zij adviseert daarom deze gist in te delen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens adviseert de COGEM om *P. kluyveri* op te nemen in Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo.

Referenties

1. Ministerie van Infrastructuur en Milieu. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/> (bezoekt op 17-05-2021)
2. Hawksworth DL (2011). A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. *IMA Fungus* 2:155-162
3. Hawksworth DL (2015). Proposals to clarify and enhance the naming of fungi under the International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants. *IMA Fungus*. 6: 199–205
4. Kurtzman CP (2011). *Pichia* E.C. Hansen (1904). In: The yeasts, a taxonomic study. 5th edition, Volume 2. Eds. Kurtzman *et al.* Elsevier B.V.

5. Phaff HJ *et al.* (1987). *Pichia kluyveri sensu lato* – a proposal for two new varieties and a new anamorph. In: The expanding realm of yeast-like fungi. Eds. de Hoog GS *et al.*, Elsevier, Amsterdam, pp. 403–414. (Stud. Mycol. 30, 403–414).
6. Kurtzman CP *et al.* (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. FEMS Yeast Res. 8: 939-954
7. Becher PG *et al.* (2018). Chemical signaling and insect attraction is a conserved trait in yeasts. Ecol. Evol. 8: 2962-2974
8. The Yeasts database (2020). Eds. Boekhout T *et al.* https://theyeasts.org/page/YeastsSpecies_table (bezocht: 12-05-2021)
9. Vincente J *et al.* (2021). High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. Int. J. Mol. Sci. 22: 1196
10. Röcker J *et al.* (2016). Usage of different aerobic non-Saccharomyces yeasts and experimental conditions as a tool for reducing the potential ethanol content in wines. Eur. Food Res. Technol. 242: 2051-2070
11. Varela J & Varela C (2019). Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. Curr. Opin. Biotechnol. 56: 88-96
12. Contreras A *et al.* (2014). Evaluation of non-saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. Appl. Environ. Microbiol. 80: 1670–1678
13. Amaya-Delgado L *et al.* (2013). Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. World J. Microbiol. Biotechnol. 29: 875-881
14. Méndez-Zamora A *et al.* (2021). The non-Saccharomyces yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation. FEMS Yeast Res. 20: foaa067
15. Jolly NP *et al.* (2014). Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Res. 14: 215–237
16. Wang C *et al.* (2020). Coffee flavour modification through controlled fermentations of green coffee beans by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri*: Part I. Effects from individual yeasts. Food Res. Int. 136: 109588
17. Crafaek M *et al.* (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. Int. J. Food Microbiol. 167: 103-116
18. Moreira I *et al.* (2021). Influence of *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* as starters on chocolate flavour. J. Sci. Food Agric. doi: 10.1002/jsfa.11082
19. Gusmer Enterprises Inc. Brewing. Chri. Hansen SmartBev NEER <https://www.gusmerbeer.com/catalog/yeast/chr-hansen-smartbev-neer/> (bezocht: 11-05-2021)
20. Chr Hansen. FROOTZEN® - first ever *Pichia kluyveri* yeast. <https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/frootzen-first-ever-pichia-kluyveri-yeast> (bezocht: 11-05-2021)
21. Saerens S & Swiegers JH (2017). Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains. US patent US 9580675 B2
22. Labbani FK *et al.* (2015). A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek 107: 961-970

23. Mewa-Ngongang M *et al.* (2019). The use of *Candida pyralidae* and *Pichia kluyveri* to control spoilage microorganisms of raw fruits used for beverage production. *Foods* 8: 454
24. Belda I *et al.* (2017). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins (Basel)* 9: 112
25. Middelbeek EJ *et al.* (1980). Effects of *Pichia kluyveri* killer toxin on sensitive cells. *Antonie van Leeuwenhoek* 46: 205-220
26. Starmer WT & Lachance MA (2011). *Yeast Ecology*. In: *The Yeasts, a Taxonomic Study*. 5th edition, Volume 1. Eds. Kurtzman *et al.* Elsevier B.V.
27. Gier S *et al.* (2017). Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins (Basel)*. 9: 345
28. COGEM (2018). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal apathogene en pathogene schimmels. COGEM advies CGM/180430-01
29. American Type Culture Collection (ATCC). <https://www.atcc.org/products> (bezocht: 11-05-2021)
30. Hoog de GS *et al.* (2014). *Atlas of Clinical Fungi*, Atlas version 4.1.4, 4e editie
31. USDA ARS Fungal database. <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/> (bezocht op 12-05-2021)
32. Plant-Host Interactions, PHI-base. <http://www.phibase.org/> (bezocht op 12-05-2021)
33. EPPO-Q-Bank. Comprehensive databases on quarantine plant pests and disease. <https://qbank.eppo.int/> (bezocht op 12-05-2021)
34. American Phytopathological Society (APS). <https://www.apsnet.org/Pages/default.aspx> (bezocht: 12-05-2021)