

Solicitação:

Amyris Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda. , detentora do CQB 255/08, vem, respeitosamente, à presença desta Comissão, por meio de seu representante legal, Sr. Roel Win Collier, requerer a liberação comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1979 geneticamente modificada para produção de farneseno.

Saccharomyces cerevisiae

A levedura *S. cerevisiae*, citada na literatura como agente de fermentação, é utilizada na indústria de alimentos e bebidas em diversas formas. Em forma ativa, a *Saccharomyces* é utilizada na indústria de panificação, na fermentação alcoólica e em outros processos fermentativos (Yamada *et al.*, 2003). Na forma inativa, essa levedura tem sido muito usada na alimentação animal, como fonte de proteína e outros nutrientes; enquanto que na alimentação humana, a *Saccharomyces* tem sido utilizada principalmente na forma de derivados, como aromatizante, realçador de sabor e complemento nutritivo, por possuir fonte de proteínas de alta qualidade, de vitaminas do complexo B e minerais, especialmente selênio e zinco. Para tanto, a *S. cerevisiae* é produzida por processos bem controlados, em fermentadores, com elevado grau de pureza.

Além de apresentar elevado teor em proteína (30 a 70 %), os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), em minerais, em macro e microelementos, particularmente selênio e fibra dietética, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas. Apresenta uma diversidade de aminoácidos, sendo uma excelente fonte de lisina, o que faz da levedura um complemento ideal.

As leveduras secas apresentam uma composição química aproximada de 6 % de umidade, 45 % proteína, 6 % de lipídeos e 9 % de cinzas. Como substância de reserva, as leveduras acumulam trealose, glicogênio e lipídeos. Destacando-se os componentes da parede celular: glicana, manana e quinina.

Diferentes técnicas podem ser empregadas quanto à utilização da biomassa de levedura. Antigamente, recuperava-se o máximo de leveduras do gênero *Sachharomyces* da produção de bebidas fermentadas, principalmente cervejas, utilizando-as em panificação. Estas linhagens devem ser cuidadosamente selecionadas, de modo a atender conjuntamente as condições do processo de propagação e as exigências da panificação e devem apresentar características como: estabilidade durante a conservação da cultura, capacidade de crescimento sob condições de elevada aeração, elevada capacidade de propagação nos mais diferentes substratos, entre outros. Em 1968,

Fleischmann iniciou a produção industrial da levedura prensada e contribuiu para a melhoria da bioquímica da fermentação.

O nitrogênio, devido a sua importância para as leveduras, é considerado um elemento essencial para a multiplicação e crescimento das mesmas. Este nutriente entra como constituinte de várias substâncias orgânicas encontradas nas leveduras, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, piridinas, purinas pigmentos respiratórios, lecitina, vitaminas e cefalina. Para que possa ocorrer uma contínua produção de novas células, torna-se necessário a adição de nitrogênio extracelular. A forma como este nutriente se encontra disponível no meio é de grande importância para o seu aproveitamento, sendo a mais favorável a amoniacal; na sua ausência são utilizadas outras fontes, e como consequência há um aumento de produção de compostos secundários, como álcoois isoamílico, amílico e propílico.

As proteínas presentes nas leveduras, além de exercerem importantes funções metabólicas, apresentam grande interesse comercial. A levedura resultante da fermentação alcoólica industrial está sendo recuperada na forma de subproduto para ser comercializada como alimento protéico, para ração animal, no mercado interno e externo; é também destacado que geralmente o conteúdo protéico dos microrganismos é mais elevado em relação à maioria das outras fontes (Nogueira e Oliva Neto, 2000). A ampla utilização da levedura de panificação é uma evidência que comprova seu perfil de segurança favorável. Diversas agências governamentais estudam e aprovam a utilização da levedura de panificação. O órgão americano responsável pelo controle de medicamentos e alimentos (Food and Drug Administration - FDA) classifica a *S. cerevisiae* como GRAS (Generally Recognized As Safe), após estudar extensivamente o microrganismo. O Instituto Nacional de Saúde americano (National Institutes of Health - NIH) considera a *S. cerevisiae* tão segura, que a maioria dos experimentos que a envolvem são isentas de suas orientações (NIH, 2002). Da mesma maneira, a EPA isenta a *S. cerevisiae* da maior parte das cláusulas previstas no Toxic Substance Control Act (legislação americana que regula a introdução de novos produtos químicos no mercado). Portanto, a *S. cerevisiae* é empregada como organismo eucariótico modelo padrão em estudos nas áreas de microbiologia, biologia celular, bioquímica e genética.

Descrição do OGM

A cepa geneticamente modificada utilizada pela Amyris Inc., cepa Y1979, deriva da cepa comercial de *S. cerevisiae* conhecida como PE-2, extensivamente utilizada na indústria brasileira de etanol. A cepa PE-2 tolera bem as condições severas do processo industrial que inclui altas concentrações de etanol. PE-2 foi originalmente isolada de dornas de fermentação da Usina da Pedra, em 1994, no estado de São Paulo, e se mostrou eficiente em outras usinas para a produção de

álcool etílico, com bom tempo de permanência nas dornas sem serem substituídas por leveduras selvagens.

A *S. cerevisiae* foi geneticamente modificada para produzir eficientemente o farneseno. Isto foi conseguido pela introdução de um único transgene, o gene *FS* (GenBankAAX39387.1), que codifica a *farneseno sintase* (Gene Bank AAX39387.1) da planta artemísia (*Artemisia annua*, Asteraceae) usada há séculos para tratar febres e mais recentemente para tratar malária em humanos, foi o único transgene de outra espécie incorporado a cepa Y1979. A *farneseno sintase* 67 kDa converte o intermediário intracelular *FPP* em farneseno. Além da introdução do gene *FS*, foram introduzidas cópias adicionais de genes endógenos de *S. cerevisiae* da via do mevalonato sob controle de promotores da própria *S. cerevisiae*. A cepa final Y1979 contém a via do mevalonato de cepas nativas expressa com os mesmos promotores de tais cepas nativas, mas com cópias adicionais expressas com promotores de outras de *S. cerevisiae*, tais como aqueles envolvidos no metabolismo central ou na utilização de galactose. A modificação para superexpressão da rota nativa do mevalonato resulta no aumento do fluxo de carbono dentro da rota e provê mais substrato *FPP* para *FS* do que proveria a rota nativa. O nocaute dos genes *STE5* e *IME1* geraram uma cepa sem capacidade de reprodução sexuada a um nível detectável e esporulação. O gene *STE5* é necessário para a reprodução sexuada em *S. cerevisiae* e em cepas cujo *STE5* é ausente mostram uma redução da eficiência de reprodução em até seis ordens de magnitude. O gene *IME1* é o principal regulador transcricional da meiose e mutantes com deleção do gene falham em esporular. Esse mesmo gene, *IME1*, é um regulador positivo da meiose em *S. cerevisiae*. A integração de marcadores de fragmentos de ADN (knock-in) foi procedida por etapas de remoção ou “reciclagem” de marcadores da via “URA blasting. Resumidamente, na auxotrofia de uracila, um cassete de ADN, contendo o gene *URA1* (que codifica orotidina-5'-monofosfato descarboxilase) e suficiente sequência homologa de ADN flanqueador para o alvo, foi inserido no gene de resistência alvo inativando, então, o gene de resistência. O gene *URA1* foi subsequentemente removido pela seleção contada em placas de ágar contendo o antimetabólito, *5-FOA*. Este processo foi repetido até que todas as integrações desejadas estivessem completas e todos os marcadores de seleção (genes para resistência a antibióticos, por exemplo) fossem removidos.

Considerando que:

1 - Não existem interações com efeitos adversos observados na cepa Y1979. O gene alvo, da *farneseno sintase*, é o único gene que expressa uma proteína não nativa. Os outros genes *TRP1*, *ADE1*, *URA3*, *GAL7*, *GAL4*, *ERG12*, *ERG8*, *ERG9*, *ERG12*, *ERG19*, *ERG20*, *CTR3*, *IDI1*, *HMG1*, *LEU2*, *GAL80*, *IME1*, e *STE5* são oriundos da própria *S. cerevisiae* e tem funções de regulação da rota do mevalonato e de balanço do fluxo de carbono;

2 - Não existe qualquer evidencia de que estes genes ou seus produtos estão associados a efeitos adversos em seres humanos ou meio ambiente.

3 - A Cepa Y1979 foi modificada a partir da cepa PE-2. A linhagem PE-2, conhecida popularmente como linhagem da Usina da Pedra, isolada e identificada em 1994, é utilizada na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar no Brasil em cerca de 30% das usinas no país sendo responsável, portanto, por 10% do etanol produzido no mundo.

4 - Em geral, nenhuma evidência na literatura foi encontrada que indique que as modificações genéticas para *S. cerevisiae* (baseado nos genes ou em produtos genéticos) estão associadas com a presença de virulência, patogenicidade, persistência, ou invasividade, comparado á levedura mutante que está geralmente presente no meio ambiente. Portanto, essas alterações feitas na cepa PE-2, para obter a cepa modificada Y1979, não devem causar efeitos adversos aos seres humanos, animais ou meio ambiente, mesmo em caso de liberação acidental.

5 - O farneseno é um feromônio de natural secretado por afídeos em doses baixas considerando os possíveis efeitos toxicos, porém, em doses muito elevadas pode ser tóxico para insetos [35]. No processo proposto a fermentação será feita em sistema fechado, sendo extremamente improvável que haja a liberação de quantidades desta substância em concentrações no meio ambiente que possa ser toxica ao homem, animais e meio ambiente. Trabalhos realizados no Laboratório MB Research Laboratories (Spinnestown, Pennsylvania, EUA) sobre a DL50 do farneseno em ratos determinou ser superior a 5000 mg/Kg de peso. Nestas dosagens também não se observou respostas no teste dermal até 24 horas, tendo uma resposta muito tênue no sétimo dia e uma resposta fraca no décimo quarto dia.

6 - Os testes realizados pela empresa e demonstrados no proposta não foram observados efeitos pleiotrópicos ou epistáticos dos genes inseridos.

7 - É desconhecida a patogenicidade de *S. cerevisiae* , a detecção única dessa levedura em isolados clínicos de indivíduos extremamente imunocomprometidos é muito rara. Há de se ressaltar também que essa levedura está presente em diversos alimentos tais como cascas de frutas, cascas de grãos, massas, pães, bebidas fermentadas; essa ampla distribuição garante que praticamente toda população humana, ao longo dos séculos, tem mantido contato direto com alimentos contendo *S. cerevisiae* .

8 - Amyris Crystalserv Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda realizou experimentação e com laboratórios independentes (laboratório do Prof. Dr. Italo Delalibera Jr – Departamento de Entomologia e Acarologia – Esalq/USP, e laboratório do Prof. Dr. Wellington Luiz de Araújo – Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes) para possíveis riscos ambientais derivados da utilização da Y1979. Nesses estudos foi avaliado se a presença de Y1979 altera de algum modo a diversidade e quantidade microbiana presente no solo em comparação a presença da cepa controle PE-2. Não foi detectada alteração em organismos aquáticos expostos a cepa Y1979, bem como na resposta de insetos a ao farneseno.

9 - Conforme relatado anteriormente e descrito não há evidências de que a cepa Y1979 possa produzir metabólitos e proteínas potencialmente tóxicas ou que possam causar efeitos adversos ao consumidor, animal ou humano. A DL50 do farneseno é superior 5000 mg/kg de peso. Até esta dosagem nenhum dos animais morreram. Além disso, a Amyris não pretende usar a cepa Y1979 e o farneseno para consumo humano ou animal. É improvável que o ser humano ou animal venha a ingerir tais doses acidentalmente. A enzima *farneseno sintase*, produto de expressão do gene alvo, não apresenta similaridade com alérgenos conhecidos, e que animais testados não apresentaram reações alérgicas após ingestão da levedura cepa Y1979, conforme descrito anteriormente.

Conclusão:

Considerando as observação da literatura e a descrição dos experimentos realizados pela empresa Amyris Crystalserv Pesquisa e Desenvolvimento de Biocombustíveis Ltda, são favoráveis a solicitação de uso industrial da cepa Y1979 para produção do farneseno, componente fundamental para a produção de combustível. Não há dúvidas sobre *Saccharomyces cerevisiae* ser um organismo corriqueiramente presente no processo de civilização humana; a cepa PE-2 foi encontrada e descrita em 1994 como prevalente em usinas produtoras de álcool no estado de São Paulo; as modificações desenvolvidas na Y1979 a partir da PE-2 não geraram quaisquer novos riscos, os quais foram confirmados por experimentação apresentada pela empresa e por laboratórios independentes.

Referências:

- 1- Goffeau, A. et al, *Science*. 1996 274(5287): 546, 563 – 567.
- 2- Brachmann C.B. et al, *Yeast*. 1998 14(2):115-32.
- 3- Dequin S. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001 56(5-6):577-88.
- 4- Basso, L.C. et al., *FEMS Yeast Res*. 2008 8(7):1155-63.

- 5- Argueso, J.L. et al, *Genome Res.* 2009 Oct 7. PMID: 19812109.
- 6- Picaud, S. et al. *Phytochemistry.* 2005 66(9):961-7
- 7- Marcus, S. et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 91(16):7762-6.
- 8- Kassir, Y. et al. *Cell.* 1988 Mar 25;52(6):853-62.
- 9- Ângeli, D.F. de; Thomazin E.E.M. (1980). *Revista Brasileira de Química.* V. 88, n. 533, 113-115p.
- 10- Angelis, R.C. (1995). *Cadernos de Nutrição*,10, 8-29.
- 11- Bailey, J.E. & Ollis. D.F. (1986). *Biochemical engineering fundamentals.* McGraw-Hill International Editors, 2º ed.
- 12- Barnett, J.A. (1976). *Advanc. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32. 125-234p
- 13- Bradford, M.M. (1975). *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- 14- Caplice, E. & Fitzgerald, G. F. (1999). *International Journal of Food Microbiology.* 50: 131-149p.
- 15- Chester, V. E. (1959). . *Nature*, 183(4665), 902-903p.
- 16- De Deken, H. (1966). *J. Gen. Microbial*, 44, 149-156.
- 17- Fink, G.R. (1970). *Methods Enzimol.*, 17. 59-78.
- 18- Habibi, Y., Mahrouz, M. & Vignon, M. R. (2005). *Carbohydrate Polymers*, 60, 319-329.
- 19- Halász, A. & Lásztity, R. (1991),*CRC Press*, 312p.
- 20- Kilberg, R. (1972). *Annual Review of Microbiology.* 26(5), 428-446p.
- 21- Peppler, H. J. (1970).. *The Yeasts*, 8, 421-463.
- 22- Romanos, M. A., Scorer, C. A., Clare, J. J. (1992). *Yeast* 8, 423-488p.
- 23- Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F.
- 24- *Fitoterapia.* 2009 Jan;80(1):68-72.
- 25- Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP.
- 26- *Phytochemistry.* 2008 May;69(8):1732-8.
- 27- Siderhurst MS, Jang EB.
- 28- *J Chem Ecol.* 2006 Nov;32(11):2513-24.
- 29- Chisti Y: Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 2007, 25:294-306.
- 30- Hu Q, Sommerfeld M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert M, Darzins A *Plant J* 2008, 54:621-639.
- 31- Demirbas A: Progress and recent trends in biofuels. *Progr Energy Combust Sci* 2007, 32:1-18.
- 32- Huber GW, Iborra S, Corma A: Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chem Rev* 2006, 106:4044-4098.
- 33- Antoni D, Zverlov VV, Schwarz WH: Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 77:23-35.
- 34- Fortman JL, Chhabra S, Mukhopadhyay A, Chou H, Lee TS, Steen E, Keasling JD: Biofuel alternatives to ethanol: pumping the microbial well. *Trends Biotechnol* 2008, 26:375-381.

- 35- Lee SK, Chou H, Ham TS, Lee TS, Keasling JD: Metabolic engineering of microorganisms for biofuels production: from bugs to synthetic biology to fuels. *Curr Opin Biotechnol* 2008, 19:556-563.
- 36- Mathew A Rude, Andreas Schirmer, *Current Opinion in Microbiology, Volume 12, Issue 3, June 2009, Pages 274-281*