

## PARECER CONSOLIDADO SETORIAIS VEGETAL/AMBIENTAL

**Processo nº:** 01200.001454/2013-37

**Requerente:** Bio Celere Agroindustrial Ltda.

**CQB:** 352/12

**Próton:** 11865/13

**Assunto:** Parecer consolidado para Liberação Comercial

Membros relatores: Marcia Pinheiro Margis e Ricardo Vilella Abdelnoor

**Extrato Prévio:** 3609/13 publicado em 22/05/13

**Reunião:** 04/12/2013

**Decisão:** DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à biossegurança de produto para liberação comercial, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico, tendo sido coincidentes os pareceres dos dois membros designados pelas Subcomissões Ambiental e Vegetal.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu Decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

### PARECER TÉCNICO

A requerente, através dos preceitos estabelecidos na Resolução Normativa 05 da CTNBio, solicita análise e emissão de parecer técnico referente à linhagem RN1016 de Levedura *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol. O organismo geneticamente modificado é uma levedura da espécie *S. cerevisiae*, com um constructo que possui o gene codificador da xilose isomerase, oriundo do fungo não patogênico *Piromyces* sp.. A levedura também possui uma expressão aumentada dos genes endógenos *XKS1*, *TAL1*, *TKL1*, *RPE1* e *RK11* e deleção do gene *GRE3*. A requerente pretende utilizar este OGM para as finalidades de transporte, comercialização, produção industrial de etanol, descarte e quaisquer outras atividades relacionadas ao propósito desse OGM e progênies dele derivadas.

#### 1. Antecedentes

Trata-se de uma levedura modificada, cujo organismo convencional é amplamente distribuído na natureza e utilizado em diversas atividades humanas como a produção de pães, cerveja, etanol, etc e cujo descarte no ambiente não está associado a qualquer dano ambiental. A levedura

*Saccharomyces cerevisiae* (Linhagem RN016) foi modificada por recombinação homóloga, com a consequente introdução do gene *XylA* (codificador da enzima xilose isomerase) proveniente do fungo *Piromyces* sp., que também possui ampla distribuição na natureza, não se conhecendo qualquer potencial patogênico do mesmo a homem e animais. A modificação também incluiu o aumento da expressão dos genes naturais da levedura *XKSI*, *TALI*, *TKLI*, *RPE1* e *RKII* e a deleção do gene *GRE3*. A expressão de *XylA* permite que a levedura fermente xilose levando a produção de etanol. Tal fenótipo possibilita a utilização de biomassa como fonte de carbono, otimizando os processos produtivos em plantas industriais destinadas à produção de álcool.

## **2. Características do OGM:**

### **2.1 Organismo transformado**

A Cepa RN1016 foi obtida pela transformação da levedura *S. cerevisiae*, um microrganismo amplamente utilizado na alimentação e nos processos fermentativos, com ampla literatura sobre genômica, transgenia e segurança, sendo utilizada desde os primórdios da civilização na indústria de alimentos e bebidas. Internacionalmente ela é classificada como “GRAS” (*Generally Recognized as Safe*) pelo conjunto de características que atestam sua segurança do ponto de vista da saúde humana, animal e ambiental (*cf. pg. 42 do documento base encaminhado pela requerente*).

### **2.2 Organismo doador do transgene**

O fungo ruminal anaeróbico *Piromyces* sp. (ATCC 76762) foi o doador do único gene utilizado na transformação da cepa RN1016. Ele apresenta um papel importante na quebra enzimática do rúmen, fornecendo nutrientes a partir da degradação dos polissacarídeos vegetais, garantido aos animais ruminantes acesso à fontes energéticas vegetais. Tal característica certamente foi determinante na escolha da transformação gênica, uma vez que tal fungo possui uma alta capacidade de degradação da celulose (*pg. 79 e seguintes do documento base encaminhado pela requerente*).

O gene da xilose isomerase (*XylA*), obtido de *Piromyces* sp., participa apenas no metabolismo de carboidratos, não havendo na literatura indicação de relação do mesmo com virulência ou

patogenicidade a outros organismos. Tal condição é relevante do ponto de vista da segurança da transformação genética. Outras modificações genéticas foram feitas no cromossomo da levedura, buscando a estabilidade ao longo das gerações. Tais modificações visam aumentar a expressão de genes endógenos da levedura, com o consequente aumento da eficiência do processo fermentativo e eliminação da capacidade de esporulação da levedura transformada.

Como indicado acima, a transgenia consiste apenas na introdução do gene da xilose isomerase (XI, D-xilose isomerase (EC 5.3.1.5), que catalisa a reação reversível de D-xilose a D-xilulose, muito utilizada na indústria para a produção de xaropes, como o de milho com alto teor de frutose (*cf. pg 71 e 111 do documento base encaminhado pela requerente*). Portanto, trata-se de uma enzima com o histórico consagrado de uso na indústria alimentícia, tanto no consumo como na manipulação e descarte.

A linhagem RN1016 não apresenta capacidade esporulativa, em face ao seu genótipo MATa/MATa, por isso não consegue persistir por períodos prolongados no solo ou qualquer outra matriz ambiental, sendo muito suscetível à dessecação, conforme os detalhados ensaios laboratoriais apresentados no dossiê em análise. Por não apresentar ciclo sexual, é limitada quanto ao cruzamento com indivíduos selvagens, o que é extremamente relevante do ponto de vista ambiental.

A utilização pretendida deste OGM será exclusivamente para a fermentação em sistema fechado, tendo como únicos subprodutos a lignina, resultante da filtragem do hidrolisado fermentado e a vinhaça, produto típico da indústria do etanol, que neste caso poderá sofrer tratamento com luz ultravioleta para garantir esterilização ou tratamento por um processo de aquecimento para aumento de concentração e consequente inativação de qualquer levedura, conforme o caso. A lignina resultante poderá ser utilizada na geração de calor na própria usina.

Sendo assim, a capacidade limitada de dispersão ambiental, o uso pretendido em sistema industrial fechado e as características de processamento, são os pontos relevantes a se considerar na avaliação dos impactos ambientais. Comparando-se com a produção convencional de álcool a partir do caldo de cana, não se vislumbra diferenças significativas de processamento, a não ser o fato de representar uma produção de etanol de segunda geração.

### 2.3 Identificação dos alvos de proteção a potenciais danos ambientais a ao agroecossistema representados pela liberação acidental da levedura RN1016

A requerente corretamente identificou os potenciais danos a alvos de proteção especificados na legislação brasileira, assim como seus mecanismos causais hipotéticos (*cf. pg. 6 do documento base encaminhado pela requerente*):

- (1) sobrevivência e dispersão na água e no solo;
- (2) impacto na biodiversidade e organismos indicadores do solo e água;
- (3) impacto nas características físico-químicas da água e do solo;
- (4) impacto na micro biodiversidade da água e do solo;
- (5) tolerância a agentes esterilizantes físicos e químicos e;
- (6) potencial alergênico.

Com base nestes elementos de risco a requerente realizou uma ampla revisão bibliográfica e conduziu um conjunto extenso de experimentos dirigidos a avaliar os potenciais riscos associados ao manuseio da levedura, aos sistemas de inativação e a uma eventual liberação acidental. O detalhamento experimental e bibliográfico pode ser acessado como se segue:

- **Sobrevivência e dispersão:** pg. 138 e seguintes; pg 157 e seguintes; pg. 210 e seguintes.
- **Impacto nas características físico-químicas da água e do solo:** pg 171 e seguintes; pg. 225 e seguintes.
- **Impacto na biodiversidade e organismos indicadores do solo e da água:** pg. 138 e seguintes; pg 171 e seguintes.
- **Tolerância a agentes esterilizantes físicos e químicos:** pg.58 e seguintes; pg. 164 e seguintes.
- **Potencial alergênico:** pg 149 e seguintes.

Toda a metodologia e a discussão dos resultados estão apoiadas por bibliografia de forma extensa e completa (*cf. pg. 277 a 289 do documento base encaminhado pela requerente*).

## Parecer consolidado final

Baseados na ampla e completa informação contida no dossiê encaminhado pela requerente, na literatura pertinente e na experiência prévia no uso industrial de leveduras no processo de produção de etanol;

Considerando, outrossim, que *S. cerevisiae* é uma levedura bem conhecida, com seu genoma sequenciado, com histórico seguro de utilização na indústria para múltiplos usos;

E considerando ainda que:

- O uso pretendido desta levedura para produção de etanol de segunda geração não envolve diferenças significativas do processo industrial comum de fermentação de garapa, que inclui sistema fechado e posterior inativação.
- **O doador do gene não é um patógeno** de humanos nem de animais e que o gene XylA participa apenas na catálise da reação reversível de D-xilose a D-xilulose, processo conhecido amplamente na indústria alimentar.
- **O organismo transformado é considerado seguro** e amplamente empregado na indústria e mesmo nos processos fermentativos artesanais.
- A enzima xilose isomerase, **única nova proteína produzida pela levedura em análise**, é amplamente empregada na indústria alimentar.
- **A expressão do novo gene**, assim como a alteração dos níveis de expressão de outros genes relacionados à via metabólica modificada na RN1016 **não confere à levedura recombinante quaisquer características modificadas de competitividade** no ambiente.
- **A RN1016 possui reduzida capacidade de sobrevivência**, devido à ausência de capacidade esporulante, o que limita drasticamente sua dispersão na natureza e restringe seu crescimento às dornas industriais, em condições otimizadas e sem competição com leveduras nativas ou outros microrganismos.
- **Os resíduos industriais não são fonte de exposição ambiental ao OGM**, frente às características biológicas da levedura RN1016, que facilitam a inativação dentro dos procedimentos convencionais de produção de etanol, e à baixa competitividade da levedura nos ambientes naturais, ainda que acidentalmente liberada viva.
- Procedimentos adicionais para garantir a completa inativação das leveduras transformadas estão previstos na planta industrial e serão incorporados ao processo produtivo, quando necessários.

- O produto final do processo de fermentação não se destina ao consumo humano ou animal.

Foram os dois membros relatores de parecer favoráveis ao pleito da requerente, concluindo que a levedura RN1016 não apresenta riscos ao ambiente distintos daqueles previamente identificados para as leveduras não transformadas empregadas na indústria sucroalcooleira.

Local, data:

---

**Marcia Pinheiro Margis**

**Membro da CTNBio**

### **3. Bibliografia consultada:**

Brat D, Boles E, Wiedemann B. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Apr;75(8):2304-11.

Cao Y, Xian M, Zou H, Zhang H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of xylonate. *PLoS One*. 2013 Jul 5;8(7).

Chen T, Liu W, Fu J, Zhang B, Tang YJ. Engineering *Bacillus subtilis* for acetoin production from glucose and xylose mixtures. *J Biotechnol*. 2013 Oct 9.

Dijkerman R, Ledebouer J, Verhappen AB, den Camp HJ, der Drift CV, Vogels GD. The anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2: nitrogen requirement and enzymes involved in primary nitrogen metabolism. *Arch Microbiol*. 1996 Dec;166(6):399-404.

Fan L, Zhang Y, Qu W, Wang J, Shao W. Cloning and analysis of the xylAB operon and characterization of xylose isomerase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *Biotechnol Lett*. 2011 Mar;33(3):593-8.

Gottlin-Ninfa E, Kaback DB. Isolation and functional analysis of sporulation-induced transcribed sequences from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1986 Jun;6(6):2185-97. PubMed PMID: 3537714;

- Gruenspan H, Eaton NR. A mutation allowing expression of normally silent a mating-type information in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1983 Jun;104(2):219-34.
- Ha SJ, Kim SR, Choi JH, Park MS, Jin YS. Xylitol does not inhibit xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylA as severely as it inhibits xylose isomerase reaction in vitro. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011 Oct;92(1):77-84.
- Harhangi HR, Akhmanova AS, Emmens R, van der Drift C, de Laat WT, van Dijken JP, Jetten MS, Pronk JT, Op den Camp HJ. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. *Arch Microbiol*. 2003 Aug;180(2):134-41.
- Harhangi HR, Steenbakkens PJ, Akhmanova A, Jetten MS, van der Drift C, Op den Camp HJ. A highly expressed family 1 beta-glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Apr 12;1574(3):293-303.
- Hector RE, Dien BS, Cotta MA, Mertens JA. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. *Biotechnol Biofuels*. 2013 May 30;6(1):84.
- Jones JS, Prakash L, Prakash S. Regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD7 in response to DNA damage and during sporulation. *Nucleic Acids Res*. 1990 Jun 11;18(11):3281-5.
- Kim DM, Choi SH, Ko BS, Jeong GY, Jang HB, Han JG, Jeong KH, Lee HY, Won Y, Kim IC. Reduction of PDC1 expression in *S. cerevisiae* with xylose isomerase on xylose medium. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012 Jan;35(1-2):183-9.
- Kuyper M, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Res*. 2004 Mar;4(6):655-64.
- Kuyper M, Hartog MM, Toirkens MJ, Almering MJ, Winkler AA, van Dijken JP, Pronk JT. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res*. 2005 Feb;5(4-5):399-409.
- Lee SM, Jellison T, Alper HS. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Aug;78(16):5708-16.
- Madura K, Prakash S. Transcript levels of the *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 increase in response to UV light and in meiosis but remain constant in the mitotic cell cycle. *Nucleic Acids Res*. 1990 Aug 25;18(16):4737-42.
- Paul SS, Deb SM, Punia BS, Singh D, Kumar R. Fibrolytic potential of anaerobic fungi (*Piromyces* sp.) isolated from wild cattle and blue bulls in pure culture and effect of their addition on in vitro fermentation of wheat straw and methane emission by rumen fluid of buffaloes. *J Sci Food Agric*. 2010. May;90(7):1218-26.

- Shen Y, Chen X, Peng B, Chen L, Hou J, Bao X. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Nov;96(4):1079-91.
- Saxena S, Sehgal JP, Puniya AK, Singh K. Effect of administration of rumen fungi on production performance of lactating buffaloes. *Benef Microbes*. 2010 Jun;1(2):183-8.
- Steenbakkens PJ, Irving JA, Harhangi HR, Swinkels WJ, Akhmanova A, Dijkerman R, Jetten MS, van der Drift C, Whisstock JC, Op den Camp HJ. A serpin in the cellulosome of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. *Mycol Res*. 2008.
- Thareja A, Puniya AK, Goel G, Nagpal R, Sehgal JP, Singh PK, Singh K. In vitro degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants. *Arch Anim Nutr*. 2006 Oct;60(5):412-7.
- Usher J, Balderas-Hernandez V, Quon P, Gold ND, Martin VJ, Mahadevan R, Baetz K. Chemical and Synthetic Genetic Array Analysis Identifies Genes that Suppress Xylose Utilization and Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)*. 2011 Sep;1(4):247-58.
- van Maris AJ, Winkler AA, Kuyper M, de Laat WT, van Dijken JP, Pronk JT. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;108:179-204.
- Steinberg-Neifach O, Eshel D. Heterozygosity in MAT locus affects stability and function of microtubules in yeast. *Biol Cell*. 2002 Jun;94(3):147-56.
- Wang C, Zhang H, Cai H, Zhou Z, Chen Y, Chen Y, Ouyang P. Succinic Acid Production from Corn Cob Hydrolysates by Genetically Engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 Oct 1.
- Xiong X, Wang X, Chen S. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Rhodococcus* strains. *Appl Environ Microbiol*. 2012 Aug;78(16):5483-91.
- Yanase H, Miyawaki H, Sakurai M, Kawakami A, Matsumoto M, Haga K, Kojima M, Okamoto K. Ethanol production from wood hydrolysate using genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Jun;94(6):1667-78.
- Zhou H, Cheng JS, Wang BL, Fink GR, Stephanopoulos G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*. 2012 Nov;14(6):611-22.