



Há informação Confidencial no corpo deste Parecer?	
X	SIM
	NÃO

Processo SEI nº: 01245.014118/2022-29
Requerente: Lallemand Soluções Biológicas Ltda.
Endereço: Estrada Prof. Messias José Baptista, 2007 Cx. Postal 370
 Piracicaba – SP, CEP: 13400-970
CQB: 369/14
Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, Linhagens M32465, M32679 e M32680 e seus derivados.
Extrato Prévio: 8507/2022, publicado no Diário Oficial da União em 27 de setembro de 2022.
Reunião: 256ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 10 de novembro de 2022.
Decisão: DEFERIDO

1. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA

O Responsável Legal da Lallemand Soluções Biológicas Ltda., Sr. Herbert Danner, solicita parecer para liberação comercial do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32465, M32679 e M32680 a serem utilizadas na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, com processo de fermentação já estabelecido pelo setor industrial, a ser analisado de acordo com as normas postuladas pela Resolução Normativa nº 21, de 15 de junho de 2018.

A CTNBio informa que de acordo com o parágrafo 5º do artigo 38 do Regimento interno da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança e

instruído pela NOTA TÉCNICA Nº 60/2022/SEI-CTNBio - Membros, o Presidente da CTNBio manteve o sigilo concedido para as informações contidas no volume confidencial, processo: 01245.014120/2022-06.

De acordo com o art. 14 da Resolução Normativa nº 21, de 15 de junho de 2018, a proposta a que se referir a um derivado de MGM deverá conter os itens: I - requerimento de liberação comercial datado e assinado pelo responsável legal; II - cópia do parecer técnico da CIBio sobre a proposta; III - declaração de veracidade das informações fornecidas assinada pelo responsável legal; IV - resumo executivo, contendo um síntese da proposta; V - Plano de Monitoramento pós-liberação comercial; VI - informações relativas ao MGM (Anexo I); VII - avaliação de risco à saúde humana e animal (Anexo II); VIII - avaliação de risco ao meio ambiente (Anexo III).

A Declaração de Veracidade das informações encontra-se na página 6 do documento SEI [10367471](#).

A Comissão Interna de Biossegurança emitiu a seguinte conclusão (página 5 do documento SEI [10367471](#)):

"Assim, a CIBio da Lallemand Soluções Biológicas Ltda. conclui que as linhagens M32465, M32679 e M32680 da levedura *S. cerevisiae*, assim como suas biomassas obtidas no final do processo de produção, são seguras à saúde humana e animal, e para o meio ambiente. Desta forma, a empresa vem requerer a aprovação comercial da linhagens de *S. cerevisiae* M32465, M32679 e M32680, junto à CTNBio para a produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil."

Informações Gerais (de acordo com informações do demandante)

A levedura *S. cerevisiae* é o principal organismo utilizado no mundo para a produção de etanol combustível. Trata-se de um organismo sem histórico de patogenicidade ou toxicidade para o ambiente, animais ou saúde humana. Ela possui status GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e é utilizada há milhares de anos na indústria alimentícia, nas áreas de panificação e bebidas fermentadas (vinhos, cerveja, entre outras bebidas destiladas), bem como no setor farmacêutico.

Após o processo de fermentação para produção de etanol a partir a partir de caldo ou melaço de cana-de-açúcar, que ocorre em um sistema fechado, automatizado e com fermentações em batelada, a cerveja de fermentação será centrifugada para recuperar a levedura que será tratada com ácido sulfúrico para reduzir a contaminação por bactérias e, em seguida, será devolvida ao recipiente de fermentação onde o processo será reiniciado pela alimentação adicional de suco e/ou melaço. O vinho clarificado da centrífuga, que também contém algum excesso de levedura, é passado para a destilação para separar o etanol da água, onde as altas temperaturas inativam rapidamente a levedura. Assim, o derivado é completamente livre

de células vivas ou DNA intacto. Esse derivado de células secas e inativas é usado para a alimentação de animais.

As linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* têm como objetivo atuar como um substituto para a levedura padrão, com a intenção de assegurar aumento do rendimento de etanol e melhores condições durante o processamento da biomassa, dando maior robustez ao processo industrial do etanol de cana-de-açúcar

- Inovação apresentada pela linhagem M12156

As principais características da levedura *S. cerevisiae* linhagens M32465, M32679 e M32680 são de aumentar o rendimento de etanol a partir de açúcar. Para atingir essas características, essas linhagens foram geneticamente modificadas pela adição de enzimas codificadoras de DNA sintético de microrganismos considerados Classe de Risco 1, além da superexpressão de genes nativos de *S. cerevisiae*.

Esses microrganismos, bem como a levedura *S. cerevisiae*, possuem histórico de uso seguro nas indústrias de alimentos e rações, de forma que todas as enzimas presentes nas linhagens M32465, M32679 e M32680 são bem caracterizadas, sem que haja associação das mesmas à patogenicidade, toxicidade ou resistência a antibióticos.

-Em resumo:

- A levedura hospedeira utilizada, *Saccharomyces cerevisiae*, tem amplo histórico de uso seguro nas indústrias de biotecnologia, farmacêutica, panificação, vinho e rações;
- As linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* mantêm parâmetros de crescimento semelhantes à linhagem parental não modificada e outras linhagens comerciais de levedura;
- As linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* apresentaram estabilidade genética por 100 gerações;
- Não há antibióticos ou plasmídeos presentes nas linhagens finais de produção;
- Os organismos doadores de genes sintéticos são microrganismos considerados classe de risco 1 que têm um histórico de uso seguro nas indústrias de alimentos e rações ou em aplicações técnicas;
- Na produção de etanol de cana, não há liberação de células no meio ambiente e, ao final do processo, as células estão mortas no subproduto final (células secas e não viáveis).

Informações sobre o Organismo Geneticamente Modificados - OGM

1. A identificação do evento de transformação genética, objetivo e utilização do MGM e seus derivados

As linhagens M32465, M32679 e M32680 foram desenvolvidas para substituir a levedura padrão no processo de produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, sendo usadas para diminuir a produção de glicerol e melhorar o rendimento de etanol

Informação confidencial

As linhagens M32465, M32679 e M32680 de *Saccharomyces cerevisiae* contêm superexpressão do simportador de glicerol STL1 nativo de *S. cerevisiae* para aumentar a reabsorção de glicerol, expressão de piruvato descarboxilase e de glucoamilase para aumentar o rendimento em etanol.

Os genes inseridos e deletados, assim como os cassetes utilizados, para gerar as linhagens M32465, M32679 e M32680 são apresentados às páginas 16 a 21 do documento confidencial.

2. A classificação taxonômica

As linhagens M32465, M32679 e M32680 pertencem à espécie *Saccharomyces cerevisiae* classificada cientificamente da seguinte forma: *Eukaryota Fungi Dikarya Ascomycota Saccharomycotina Saccharomycetes Saccharomycetales Saccharomycetaceae Saccharomyces Saccharomyces cerevisiae*

3. Os genes introduzidos, organismos de origem e suas funções específicas; fornecendo, quando aplicável, informações relacionadas ao número de cópias inseridas, localização do inserto no genoma e sequências flanqueadoras do gene

Informação confidencial

As linhagens M32465, M32679 e M32680 derivadas de uma linhagem parental com designação interna M17328, a qual foi derivada da linhagem triploide e de ocorrência natural de designação interna M2390, isolada a partir de uma linhagem de levedura comercial amplamente utilizada para a produção de etanol. Elas apresentam as seguintes modificações:

- 1. *Saccharomyces cerevisiae*: 3 cópias de STL1 simportador de glicerol nativo. A ORF *stl1* nativa foi substituída por cópias do gene STL1 endógeno sob o controle de um promotor constitutivo derivado de *S. cerevisiae*. Esta modificação intenciona a redução da concentração extracelular do subproduto indesejável da fermentação, o glicerol via membrana;***

2. *Zymomonas mobilis*: 3 cópias do gene piruvato descarboxilase. A enzima piruvato descarboxilase de melhora a conversão de piruvato em acetaldeído e, conseqüentemente a glicólise, em comparação com a PDC nativa de *S. cerevisiae*, que não é secretada pela levedura

3. *Penicillium oxalicum*: 3 cópias de um gene com códon de glucoamilase otimizado, PoGA. O gene da glucoamilase, sintetizado artificialmente, foi projetado para fornecer a capacidade à linhagem de hidrolisar o amido. A sequência do peptídeo sinal do gene nativo foi substituída por uma sequência sinal de secreção otimizada para melhorar a secreção da enzima. A sequência de sinal otimizada consiste na sequência de sinal OST1 nativa de *S. cerevisiae* seguida pela região pró do fator de acasalamento alfa de *S. cerevisiae* com uma única substituição de aminoácido na posição 42 de serina para lisina (S42L). A substituição S42L é comumente usada em aplicações de biotecnologia e ciência básica e não apresenta risco significativo.

4. Resumo das construções utilizadas para a obtenção do MGM e o mapa genético utilizado no processo de transformação (transgene/vetor)

Informação confidencial

As ferramentas e práticas moleculares usadas durante a construção da linhagem são padrão para o campo da biotecnologia e genética de leveduras. Um resumo das principais modificações realizadas é apresentado às páginas 22 a 25 do documento confidencial.

5. **Classificação de risco:**
Classe de risco 1

6. Os métodos utilizados para a modificação genética

Informação confidencial

*As técnicas de modificação genética utilizaram integração direcionada para inserir genes metabólicos com integrações heterólogas de *Z. mobilis* (piruvato descarboxilase), *Penicillium oxalicum* (glucoamilase) e integrações homólogas de *Saccharomyces cerevisiae*, 3 cópias de STL1 endógeno em locais específicos e conhecidos dentro o cromossomo da levedura. A abordagem utilizada foi integração direcionada no cromossomo, o que cria uma linhagem com eventos de integração estável e fácil de caracterizar e reduz a probabilidade de qualquer mobilização do DNA heterólogo melhorando a estabilidade da linhagem com relação a outras abordagens*

7. O produto da expressão do gene inserido no organismo receptor

Informação confidencial

As linhagens modificadas M32465, M32679 e M32680 de S. cerevisiae contêm 3 cópias do gene de glucoamilase de códon otimizado de P. oxalicum e 3 cópias do gene piruvato descarboxilase de Z. mobilis. Além disso, a ORF do stl1 nativo foi substituído por 3 cópias do gene STL1 endógeno sob o controle de um promotor constitutivo derivado de S. cerevisiae. As leveduras são usadas para converter melaço e caldo de cana em etanol para uso em aplicações de biocombustíveis. Não há dados que indiquem que a expressão desses genes metabólicos, intergenéricos e intragenéricos, altere as características morfológicas das linhagens modificadas em relação à linhagem não-modificada.

Em resumo:

A linhagens M32465, M32679 e M32680 de S. cerevisiae possuem a capacidade de diminuir a produção de glicerol e melhorar o rendimento de etanol por meio da introdução de piruvato descarboxilase (aumento da taxa de glicólise) e de glucoamilase para liberar glicose resultando na produção de açúcar fermentecível.

8. As técnicas de detecção gerais e específicas do MGM, apresentando metodologia pertinente

Informação confidencial

As abordagens a seguir podem ser usadas para distinguir e detectar a linhagem modificada:

- Crescimento em placas de amido; e
- PCR.

9. Avaliação de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos

Não são esperados efeitos pleiotrópicos e epistáticos nas linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas. A estabilidade genética das linhagens de produção foi avaliada por meio da caracterização da mesma após 100 gerações e não se encontrou nenhuma discrepância as linhagens melhoradas em comparação à linhagem parental.

10. A possibilidade de haver interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo MGM por técnicas de ADN recombinante

As análises conduzidas para caracterização genética das linhagens de produção e a demonstração de sua estabilidade genética e fenotípica no processo de fermentação não antecipam qualquer indício de presença de interações adversas fora do objetivo pretendido.

As modificações genéticas conduzidas nas linhagens de produção usaram técnicas que geram integrações estáveis e fáceis de caracterizar, de genes metabólicos que estão essencialmente relacionados a melhoria do rendimento de etanol de cana-de-açúcar.

11. O vetor utilizado na clonagem

A linhagem de produção é livre de vetores.

Avaliação de Risco ao Meio Ambiente

1. Sobre a possibilidade de o MGM produzir novas estruturas de resistência à estresses abióticos

Não se antecipa qualquer resistência a estresse abiótico. As linhagens de produção não foram projetadas para tolerar condições fora da normalidade de pH, temperatura, salinidade e suprimento de nutrientes. Os elementos genéticos inseridos não parecem possuir nenhum potencial de risco intrínseco. Tampouco se espera que produzam algum efeito adverso ou de resistência que diferencie o comportamento das linhagens geneticamente modificadas daquele apresentado pelo tipo selvagem.

É importante destacar que as linhagens geneticamente modificadas serão usadas para produção de etanol em fermentadores fechados. Desde a proliferação até a inoculação nos tanques de fermentação do etanol, rigorosas condições de esterilização são necessárias. Após a fermentação, a biomassa de levedura é submetida a tratamento térmicos que causam inativação e desnaturação enzimática das células, inativando-as.

2. Os agentes biocidas esterilizantes e antimicrobianos que possuem atividade contra o MGM

As linhagens de produção não contêm genes de resistência a antibióticos. Embora durante a construção genes que codificam resistência à antibióticos tenham sido utilizados para facilitar a seleção; a estratégia de engenharia genética empregada resulta em linhagens que não possuem genes de resistência.

3. A capacidade de sobrevivência e dispersão do MGM no ar, água, solo, e trato digestório quando aplicável, e seu consequente efeito na microbiota dos ambientes em que sobrevive

Não há indicações de que as modificações genéticas realizadas nas linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* tenham resultado em alterações significativas na capacidade de sobrevivência e dispersão com relação ao tipo selvagem. A construção genética usada para modificá-las, está estável e precisamente integrada no local orientado, mostrando padrões de expressão esperados e não foram observados efeitos adversos no comportamento dos microrganismos.

Dentro do contexto apresentado e considerando que as linhagens de produção não foram projetadas para tolerar condições abióticas fora do normal e que os elementos genéticos nelas inseridos para o seu desenvolvimento não parecem possuir qualquer potencial de risco intrínseco, a Lallemand entende ser razoável concluir que não é esperado que as linhagens modificadas, de sua propriedade, se comportem de forma diferente das linhagens de *S. cerevisiae* comumente encontradas na natureza.

Avaliação de Risco de Derivados de MGM

- Avaliação de Risco do Derivado à Saúde Humana e Animal

1. O histórico de uso na alimentação, no Brasil e em outros países, do derivado, o nível de consumo, o processamento anterior ao consumo e as espécies animais que se alimentam deste derivado, quando aplicável

A espécie hospedeira *Saccharomyces cerevisiae* tem um extenso histórico de uso seguro por milhares de anos em relação à nutrição humana e animal, principalmente na fermentação e preservação de alimentos. Essas leveduras foram usadas pelos antigos egípcios, romanos, gregos e hebreus nos processos de fermentação para a produção de vinho, pão e cerveja. Preparações comerciais de células de levedura e nutrientes associados, como proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerais e oligoelementos, são utilizados como suplementos alimentares ou medicamentos. Mais de 2,5 milhões de toneladas de levedura são produzidas comercialmente a cada ano em todo o mundo, tornando *S. cerevisiae* o microrganismo mais amplamente utilizado.

Segundo a Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), as leveduras utilizadas na produção de alimentos, particularmente as leveduras de panificação/cerveja, são consideradas os microrganismos mais seguros.

2. Comparações quanto a composição química e nutricional entre o derivado do microrganismo parental e do derivado do MGM, informando

os possíveis efeitos na cadeia alimentar humana e animal pela ingestão do derivado, quando aplicável

Informação confidencial

O OGM é uma levedura destinada à produção de etanol, substância química definida, cujas células estão mortas ao final do processo. O derivado é a biomassa seca inativada de leveduras resultante da produção de etanol, para possível uso em ração para animal.

*A biomassa inativada obtida de fermentação utilizando qualquer das 3 linhagens GM, onde não há mais células viáveis, é substancialmente equivalente à das linhagens de *S. cerevisiae* não modificadas e à maioria das leveduras utilizadas na produção de etanol, com ausência de toxinas ou alérgenos, tendo uma digestibilidade semelhante.*

*A Lallemand já conduziu extensas avaliações com diferentes linhagens de leveduras com integração direcionada de genes metabólicos para melhoria das condições de fermentação e aumento do rendimento de etanol, todas derivadas da *S. cerevisiae* isolada de fermentação comercial.*

3. A estabilidade à digestão e ao processamento industrial da proteína especificada pelo transgene, com base nas propriedades físico-químicas, quando aplicável

Não se aplica

4. A metodologia de inativação do MGM para produção do derivado e comprovação da eficiência do método de inativação

Informação confidencial

O método de inativação térmica empregado é baseado no entendimento geral de que as leveduras são sensíveis à temperatura e, portanto, certas exposições de temperatura e tempo são letais para suas células. Dados foram apresentados.

- Avaliação de risco do derivado ao meio ambiente

1. Os possíveis efeitos adversos sobre organismos indicadores relevantes, conforme o uso comercial proposto

As linhagens de produção não apresentam nenhuma nova proteína na história alimentar. Não há indícios que as modificações genéticas realizadas no organismo receptor para gerar as linhagens de produção tenham resultado em um organismo tóxico, uma vez que tais modificações foram

realizadas em genes metabólicos e não foram identificadas como associadas à toxicidade. De fato, não há indícios que sugiram que as linhagens tenha comportamento diferente da selvagem ou que cause danos a organismos bioindicadores.

A Lallemand Soluções Biológicas considera que as linhagens de produção não representam nenhum risco potencial e tampouco potencial impacto ambiental que possa ser distinto daquele de outras linhagens de leveduras de ocorrência natural ou modificadas já utilizadas na indústria de alimentos, rações, medicamentos ou etanol. Sua biomassa, obtida no final do processo, é segura à saúde humana e animal, e para o meio ambiente.

Plano de Monitoramento Pós-Liberação Comercial

Com base na extensa pesquisa bibliográfica, no histórico de uso seguro, na aprovação regulatória global e no seu perfil de segurança reconhecido, na ausência da menção a qualquer um destes organismos nas listas de agentes infecciosos do Ministério da Saúde ou na lista de pragas quarentenárias publicada pelo MAPA, é razoável considerar as enzimas desses microrganismos seguras para o uso pretendido de maneira que não se antecipa que as linhagens M32465, M32679 e M32680 causem quaisquer efeitos adversos em comparação ao organismo não modificado geneticamente.

O processo de uso comercial das linhagens M32465, M32679 e M32680 de *S. cerevisiae* envolve a inativação térmica e mecânica das células, os quais minimizam o risco de qualquer microrganismo vivo ser liberado no meio ambiente: a fermentação ocorre em fermentadores fechados e todas as operações de alimentação ocorrem através de bombas de alimentação e tubulações; a etapa de concentração do caldo include tratamento térmico que inativa todas as células

A Lallemand propõe o seguinte plano de monitoramento geral pós-liberação comercial das linhagens M32465, M32679 e M32680:

1. Monitoramento de possíveis efeitos adversos não previstos sobre a saúde dos trabalhadores das usinas de etanol por 2 meses, de acordo com informação fornecida diretamente pelas mesmas;
2. Monitoramento de publicações científicas que tragam possíveis informações de risco à saúde causadas por linhagens de *S. cerevisiae* usadas para a produção de etanol.

2. PARECER:

A requerente Lallemand Soluções Biológicas Ltda. solicita liberação comercial do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32465, M32679 e M32680, utilizada na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.

Os documentos encaminhados pela requerente atendem à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal, disposta na Lei 11.108/05 e seu Decreto 5.591/05 e na Resolução Normativa No 21 da CTNBio de 15 de junho de 2021. Assim, atendidas as condições descritas no processo e neste parecer técnico, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou saúde humana e animal.

Portanto, diante das informações acima mencionadas, sou pelo deferimento do processo de Liberação comercial do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32465, M32679 e M32680 Geneticamente Modificadas.

Dra. Erna Geessien Kroon
Membro CTNBio