COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 1223/2022/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO
Setoriais Saúde Humana/Animal
Dr. José Fernando Garcia

Há informação Confidencial no corpo **deste Parecer**?	
X	**SIM**
	NÃO

Processo SEI nº: 01245.011189/2022-70

Requerente: Lallemand Soluções Biológicas ltda.

Endereço: Estrada Prof. Messias José Baptísta, 2007 Cx. Postal 370 Piracicaba – SP, CEP: 13400-970

CQB: 369/14

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* M12156.

Extrato Prévio: 8470/2022, publicado no Diário Oficial da União em 08/09/2022

Reunião: 255ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 6 de outubro 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* M12156 a ser utilizado na produção de etanol a partir de milho, com processo de fermentação já estabelecido pelo setor industrial, a ser analisado de acordo com as normas postuladas pela Resolução Normativa n° 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: 01245.011190/2022-02.

De acordo com o art. 14 da Resolução Normativa n° 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.

A Declaração de Veracidade das informações encontra-se na página 8 do documento SEI 10169592.

A Comissão Interna de Biossegurança emitiu a seguinte conclusão (páginas 5 a 7 do documento SEI 10169592):

> "Assim, a CIBio da Lallemand Soluções Biológicas Ltda. conclui que a S. cerevisiae M12156, assim como sua biomassa obtida no final do processo, é segura à saúde humana e animal, e para o meio ambiente. Desta forma, a empresa vem requerer a aprovação comercial da S. cerevisiae M12156, junto à CTNBio para a produção de etanol de milho 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.

O processo de produção de etanol de milho ocorre em um sistema fechado, automatizado e com fermentações em batelada. Primeiramente, o milho é moído, hidratado e submetido ao aquecimento de 85 °C/3hs para gelatinização do amido. O amido é então liquefeito pela adição da enzima α-amilase, liberando oligossacarídeos. A mistura liquefeita, referida como “mosto”, é resfriada para 33°C e enviada para o tanque de propagação, juntamente com ureia, nutrientes, levedura *S. cerevisiae* e a enzima glucoamilase, responsável pela conversão dos oligossacarídeos em moléculas de glucose a serem convertidas em etanol. Após aproximadamente 8h de propagação, o mosto é enviado para o tanque de

fermentação e ali permanece por cerca de 48-65h à 33 °C. Posteriormente, o mosto fermentado é transferido para um tanque de armazenamento (também conhecido como “beer well”) que é subsequentemente destilado dando origem ao etanol e à vinhaça. O etanol é diretamente transferido para os tanques de combustível e a vinhaça é centrifugada para a separação das partes líquida e sólida. O residual líquido é concentrado sob aquecimento para geração de xarope e as partículas sólidas constituídas de fibras de milho e biomassa são submetidas aos secadores dando origem aos DDGs (sigla do ingês para – grãos secos de destilaria, distiller's dried grains with solubles), um farelo contendo 32% de proteína que pode ajudar o Brasil a transformar proteína vegetal em proteína animal. Além de que a própria usina de etanol pode produzir açúcares de milho no mesmo processo.

Embora as estimativas de produção de etanol de milho no Brasil sejam promissoras, as metas propostas somente serão alcançadas com o auxílio de leveduras específicas para o processo de conversão do amido do milho em etanol, que promovam melhorias na eficiência do processo fermentativo e resultem no aumento do rendimento, tal como a linhagem M12156.

A linhagem M12156 de *S. cerevisiae* tem como objetivo atuar como um substituto para a levedura padrão com a intenção de reduzir ou eliminar a necessidade de glucoamilase produzida exogenamente que é tradicionalmente adicionada, melhorar o rendimento do etanol e melhorar as condições de fermentação durante o processamento da biomassa.

- Inovação apresentada pela linhagem M12156

A levedura *S. cerevisiae* M12156 tem como principais características a expressão da enzima glucoamilase, a diminuição de glicerol e o aumento de rendimento em etanol a partir da fermentação do milho. Para atingir tais características, essa linhagem foi geneticamente modificada, por meio da deleção e superexpressão de genes endógenos de *S. cerevisiae* e adição de genes provenientes de microrganismos considerados classe de risco 1. Esses microrganismos, bem como a levedura *S. cerevisae*, possuem histórico de uso seguro nas indústrias de alimentos e rações, de forma que todas as enzimas presentes na linhagem M12156 são bem caracterizadas, sem que haja associação das mesmas à patogenia, 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;

- A linhagem *S. cerevisiae* M12156 mantêm parâmetros de crescimento semelhantes à linhagem parental não modificada e outras linhagens comerciais de levedura;

- A linhagem *S. cerevisiae* M12156 apresentou estabilidade genética por 100 gerações;

- Não há antibióticos ou plasmídeos presentes na linhagem final 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 a partir de milho, 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

A linhagem M12156 foi desenvolvida para substituir a levedura padrão no processo de produção de etanol a partir de milho, sendo usada para converter amido vegetal em etanol para uso em aplicações de biocombustíveis com a intenção de reduzir ou eliminar a necessidade de adição exógena de glucoamilase, para diminuir a produção de glicerol e melhorar o rendimento de etanol.

Informação confidencial

A linhagem M12156 é uma *Saccharomyces cerevisiae* contendo superexpressão do simportador de glicerol STL1 nativo, expressão do gene da glucoamilase de *Saccharomycopsis fibuligera* e dos genes pflA, pflB e adhE de *Bifidobacterium adolescentis*.

Os genes inseridos e deletados, assim como os cassetes utilizados, para gerar M12156 são apresentados às páginas 17 e 18 do documento confidencial.

2. A classificação taxonômica

A linhagem M12156 é uma levedura pertencente à espécie *Saccharomyces cerevisiae* classificada cientificamente28 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

A *S. cerevisiae* M12156 derivada de uma linhagem parental com designação interna M4361, a qual foi derivada da linhagem diplóide e de ocorrência natural de designação interna M2390, isolada a partir de uma linhagem de levedura comercial amplamente utilizada para a produção de etanol. Ela apresenta as seguintes modificações:

(i) *Saccharomyces cerevisiae*: 2 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;

(ii) *Saccharomycopsis fibuligera*: 4 cópias do gene glucoamilase com uma mutação no aminoácido N-terminal resultante da mutação A40N (designada como MP743). A glucoamilase produzida pela S. cerevisiae M12156 não é substancialmente diferente das formas existentes e, portanto, é segura para o uso pretendido;

(iii) *Bifidobacterium adolescentis*: 2 cópias de pflA, 2 cópias de pflB e 4 cópias de adhE, sintéticos com códon otimizados os quais compõem uma via alternativa de expressão do etanol. Por meio dessa via, o piruvato é convertido por pflA e pflB em acetil-CoA, que é então convertido em etanol por meio de adhE. A via paralela serve para gerar formato, que por sua vez serve como um reservatório de elétrons alternativo na célula modificada. Todos os elementos reguladores (promotores / terminadores) para os genes introduzidos são provenientes de *S. cerevisiae*.

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 25, 26 e 28 do documento confidencial.

As 12 etapas de construção do MGM estão descritas detalhadamente no documento confidencial: Etapa 1: Linhagem M9569: integração do cassete MA647 na linhagem M4361; - Etapa 2 - Linhagem M9766: Integração de MA1365 em M9569; Etapa 3 - Linhagem M10024: Integração de MA1969 e MA1970 em M9766; **-** Etapa 4 - Linhagem M10138: Integração de MA1362 em M10024; Etapa 5 - Linhagem 10164: Integração de MA1971 em M10138; - Etapa 6 - Linhagem M11111: Integração de MA1973 and MA1972 em M10164; Etapa 7 - Linhagem M11240: Integração de MA289.1 em M11111; - Etapa 8 - Linhagem M11348: Integração de MA982 em M11240; - Etapa 9 - Linhagem M11405: Integração de MA998 em M11348; - ETAPA 10 – Linhagem M11589: Integração de MAP630 em M11405; e Etapa 12 - Linhagem final: Integração de MAP835 em M12135.

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 *S. fibuligera* (glucoamilase) e *Bifidobacterium adolescentis* (pflA, pflB, adhE) e integrações homólogas de *Saccharomyces cerevisiae*, 2 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

A linhagem modificada *S. cerevisiae* M12156 contêm 2 genes de códon otimizado pflA e pflB e 4 cópias do gene adhE de códon otimizado de *Bifidobacterium adolescentis*. Ela contém 4 cópias do gene de glucoamailase de códon otimizado de *Saccharomycopsis fibuligera*, que também contém um sítio de glicosilação N terminal resultante da mutação

A40N (designada como MP743). Além disso, a ORF do stl1 nativo foi substituído por 2 cópias do gene STL1 endógeno sob o controle de um promotor constitutivo derivado de *S. cerevisiae*. A levedura é usada para converter amido vegetal 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 da linhagem modificada em relação à linhagem não-modificada.

Em resumo:

- Capacidade de hidrolisar amido: A linhagem M12156 expressa o gene da glucoamilase e, portanto, pode converter o amido em açúcares monoméricos utilizáveis. Além disso, a linhagem modificada expressa genes intergenéricos envolvidos em uma via paralela de etanol que não se prevê que afete a capacidade do organismo modificado de utilizar amido.

- Redução de glicerol: A produção de glicerol (subproduto não desejado na fermentação devido ao seu baixo valor) diminuiu em M12156 através da deleção da gpd2 endógeno. Além disso, o glicerol exógeno é ainda mais reduzido através da regulação positiva do simportador de glicerol stl1 nativo.

- Rota paralela de produção de etanol: Uma via alternativa de etanol composta por pflA, pflB e adhE do organismo doador *B. adolescentis* foi projetada de maneira estável no cromossomo da levedura, resultando em um rendimento geral melhorado de glicose para etanol.

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:

- Incapacidade de crescer em placas de citosina;

- Crescimento em placas de 5-fluorocitosina;

- Crescimento em placas de amido; e

- PCR.

9. Avaliação de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos

Não são esperados efeitos pleiotrópicos e epistáticos na linhagem de *S. cerevisiae* M12156 geneticamente modificada. A estabilidade genética da

linhagem de produção foi avaliada por meio da caracterização da mesma após 100 gerações e não se encontrou nenhuma discrepância da M12156 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 da linhagem 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 na linhagem 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 em processo de fermentação de milho.

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. A linhagem de produção não foi projetada 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 da linhagem geneticamente modificada daquele apresentado pelo tipo selvagem.

É importante destacar que a linhagem de geneticamente modificada será usada 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

A linhagem de produção não contém genes de resistência a antibióticos. Embora durante a construção das intermediárias entre *S. cerevisiae* do tipo selvagem e a linhagem de produção 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 na linhagem *S. cerevisiae* M12156 tenham resultado em alterações significativas na capacidade de sobrevivência e dispersão dessa linhagem com relação ao tipo selvagem. A construção genética usada para modificar a linhagem M12156, está estável e precisamente integrada no local orientado, mostrando padrões de expressão esperados e não foram observados efeitos adversos no comportamento do microrganismo.

Dentro do contexto apresentado e considerando que a linhagem de produção não foi projetada para tolerar condições abióticas fora do normal e que os elementos genéticos inseridos para o desenvolvimento desse microrganismo 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 Européia de Segurança Alimentar (EFSA), as leveduras utilizadas na produção de alimentos, particularmente as leveduras de paniicação/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, 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. Os níveis de proteína bruta e de gordura bruta no DDGS feitos com leveduras modificadas não podem ser distinguidos daqueles produzidos com leveduras convencionais. Além disso, esses valores estão dentro da faixa DGGS descrita pelo US Grain Council (2012).

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 a partir de milho, todas derivadas da *S. cerevisiae* isolada de fermentação comercial. A expressão de genes que facilitam a via alternativa do etanol, da hidrólise de amido e envolvidos da redução do glicerol não tem influência na qualidade dos DDGs produzidos.

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.

- Avaliação de risco do derivado ao meio ambiente

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

A linhagem de produção não apresenta nenhuma nova proteína na história alimentar. Não há indícios que as modificações genéticas realizadas no organismo receptor para gerar a linhagem 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 a linhagem tenha comportamento diferente da selvagem ou que cause danos a organismos bioindicadores.

A Lallemand Soluções Biológicas considera que a linhagem de produção não representa 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 a linhagem M12156 cause quaisquer efeitos adversos em comparação ao organismo não modificado geneticamente.

O processo de uso comercial da linhagem M12156 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 da linhagem M12156:

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* M12156**,** utilizado na produção de etanol a partir de milho.

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 microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* M12156 Geneticamente Modificada**.**

Dr. José Fernando Garcia
Membro CTNBio