



COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 1196/2022/SEI-CTNBio - Membros
PARECER TÉCNICO
Setoriais Vegetal/Ambiental
Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto

Há informação Confidencial no corpo deste Parecer?	
X	SIM
	NÃO

Processo SEI nº: 01245.011947/2022-50

Requerente: Lallemand Soluções Biológicas Ltda.

CQB: 396/14

Endereço: Estrada Prof. Messias José Baptista, 2007 - Bairro Itaperú Piracicaba - SP, CEP: 13400-970 / Caixa Postal 455

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379 a serem utilizados na produção de etanol.

Extrato Prévio: 8414/2022, publicado no Diário Oficial da União em 15/08/2022

Reunião: 255ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 6 de outubro de 2022.

Decisão: DEFERIDO

1. FUNDAMENTAÇÃO TÉCNICA (de acordo com informações do demandante)

O Responsável Legal da Lallemand Soluções Biológicas Ltda. solicita parecer para liberação comercial dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379 que têm como principal característica em comum o aumento no rendimento de etanol da fermentação da cana-de-açúcar, a ser analisada de acordo com as normas definidas pela Resolução Normativa nº 21, de 15 de junho de 2018. A

requerente informa que a levedura *S. cerevisiae* tem um histórico de uso seguro nas indústrias de alimentos e rações e a sua produção está de acordo com processo de fermentação já estabelecido pelo setor industrial.

Desta forma, de acordo com o art. 14 da Resolução Normativa nº 21, de 15 de junho de 2018, a proposta contém 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 apresentação do pleito de liberação comercial dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes linhagens (M32292, M32376 e M32379) está de acordo com o art. 7º da Resolução Normativa nº 21, de 15 de junho de 2018: "Poderão ser submetidos à avaliação de risco no âmbito de um mesmo processo, os MGMs que estiverem contemplados em pelo menos um dos seguintes critérios: I - diferentes MGMs transformados com a mesma construção genética ou com construções genéticas similares, desde que todas as espécies sejam classificadas como nível de biossegurança 1;"

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 61/2022/SEI-CTNBio - Membros, o Presidente da CTNBio manteve o sigilo concedido para as informações contidas no volume confidencial, processo: 01245.011950/2022-73.

A Declaração de Veracidade das informações encontra-se na página 7 do documento SEI [10235718](#).

A Comissão Interna de Biossegurança emitiu a seguinte conclusão (páginas 5 e 6 do documento SEI [10235718](#)):

"Assim, a CIBio da Lallemand soluções Biológicas Ltda. conclui que as linhagens M32292, M32376 e M32379 de *S. cerevisiae*, assim como sua biomassa obtida no final do processo, são seguras à saúde humana e animal, e para o meio ambiente. Desta forma, a empresa vem requerer a aprovação comercial das linhagens M32292, M32376 e M32379 de *S. cerevisiae*, junto à CTNBio, para a produção de etanol de cana-de-açúcar no Brasil."

Informação confidencial

Inovação apresentada pelas linhagens M32292, M32376 e M32379

As principais características da levedura *S. cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379 são de aumentar o rendimento de etanol a partir de açúcar. Para aumentar o rendimento em etanol, essas linhagens foram geneticamente modificadas pela adição de genes de microrganismo considerado de Classe de risco 1. Esse microrganismo, e também a levedura *S. cerevisiae*, possuem histórico de uso seguro nas indústrias de alimentos e rações, de modo que todas as enzimas presentes nas linhagens M32292, M32376 e M32379 estão bem caracterizadas, sem associação com patogênese, toxicidade ou resistência a antibióticos.

As linhagens M32292, M32376 e M32379 são derivadas de uma linhagem parental triploide e não-modificada, que recebeu a designação interna de M17328. Essa linhagem é uma *S. cerevisiae robustae* de ocorrência natural, escolhida por sua tolerância a condições de alto teor de etanol e lavagem ácida. O isolamento de M17328 foi muito semelhante ao background de isolamento das linhagens da Lallemand M18447, M20544, M22993 e M25319, e ao isolamento da linhagem Pe-2, a levedura hospedeira para linhagens autoclonadas previamente aprovadas da Lallemand M10682 e M15980 e linhagens GM para farneseno da Amyris, bem como SA-1, BG1, Cat-1, FT858 e Fermell, todas as leveduras que agora são amplamente vendidas no Brasil, mas foram originalmente isolados do processo de fermentação.

Estima-se que cerca de 150 linhagens diferentes de leveduras alcoólicas, principalmente, estejam comercialmente disponíveis. Além destas, as linhagens M32292, M32376 e M32379 também apresentam modificações para a expressão de gene heterólogo. É importante ressaltar que o gene heterólogo foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase a partir do DNA sintetizado, garantindo que apenas o códon alvo otimizado do DNA estivesse em contato com a linhagem alvo de *S. cerevisiae*. Em outras palavras: nem o organismo doador nem seu DNA foram realmente usados na construção das linhagens M32292, M32376 e M32379. Como tal, não há preocupações com a transferência inadvertida de codificação de DNA para características relacionadas à patogenicidade ou toxicidade.

O gene da piruvato descarboxilase, ZmPDC, introduzido nas linhagens M32292, M32376 e M32379, é baseado na sequência de *Zymomonas mobilis*. O simportador glicerol/H⁺, STL1, é autoclonado de *S. cerevisiae*. Todos os elementos reguladores (promotores/terminadores) para os genes introduzidos provêm de *S. cerevisiae*.

Adicionalmente, análises de inativação térmica e esterilidade por método químico demonstram que *S. cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e

M32379 são completamente inativadas quando submetidas a tratamento térmico em escala laboratorial ou industrial, e também quando expostas a tratamento com cloro. Acima de tudo, os resultados da inativação térmica realizada pela Lallemand indicaram que não há diferença entre as condições de morte celular das linhagens M32292, M32376 e M32379 e da linhagem não modificada M17328. No entanto, ressaltamos que as linhagens M32292, M32376 e M32379 não têm capacidade de sobreviver às temperaturas de pós-fermentação utilizadas na usina de etanol. Portanto, conclui-se que não há indícios de que estas linhagens apresentem alguma diferença na forma de inativação em relação às outras linhagens de *S. cerevisiae* existentes na natureza.

O uso pretendido para as linhagens M32292, M32376 e M32379 de *S. cerevisiae* é na produção industrial de etanol combustível derivado da cana-de-açúcar, destinado como levedura de substituição para as linhagens atuais que são utilizadas na indústria.

Informações Gerais

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

Informação confidencial

As linhagens de *Sacharomyces cerevisiae* denominadas M32292, M32376 e M32379, apresentadas neste dossiê, foram modificadas através da introdução do gene da piruvato descarboxilase, ZmPDC, baseado na sequência da bactéria *Zymomonas mobilis*, microrganismo considerado de Classe de risco 1, e da introdução de cópias adicionais do simportador glicerol/H⁺, STL1, nativo de *S. cerevisiae*.

As novas linhagens M32292, M32376 e M32379 foram desenvolvidas para substituir a levedura padrão no processo de produção da fermentação da cana-de-açúcar e são utilizadas para melhorar os rendimentos de etanol e as condições de fermentação durante o processamento da biomassa por meio de: 1) redução de glicerol através da introdução do gene PDC de *Z. mobilis* e 2) superexpressão do simportador de glicerol STL1 nativo que aumenta a reabsorção de glicerol pela célula.

Não há dados que demonstrem que a expressão desses genes, que são genes metabólicos, alterem as características morfológicas da linhagem modificada em relação à linhagem não modificada geneticamente.

No processo de produção comercial planejado para o uso das linhagens M32292, M32376 e M32379 não há liberação de células vivas no ambiente. O vinho destilado (vinhaça), que consiste principalmente de biomassa

inativada e nutrientes residuais são completamente livres de células vivas ou DNA intacto. Os genes inseridos e deletados, assim como os cassetes utilizados, para gerar as linhagens M32292, M32376 e M32379 são apresentados na Tabelas 1 e 2, apresentadas à página 15 do documento confidencial.

2. A classificação taxonômica

As linhagens M32292, M32376 e M32379 são leveduras pertencentes 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

Informação confidencial

As linhagens de M32292, M32376 e M32379 são derivadas de uma linhagem parental triploide de ocorrência natural e não-modificada, isolada de uma dorna de fermentação, que recebeu a designação interna de M17328 e apresentam as seguintes modificações:

1) Expressão de uma cópia por cromossomo (3 cópias) de um códon de gene otimizado para piruvato descarboxilase com base na sequência WP_011241152 do organismo doador *Zymomonas mobilis*. A enzima piruvato descarboxilase de *Zymomonas mobilis* melhora a conversão de piruvato em acetaldeído em comparação com a PDC nativa de *S. cerevisiae*, que não é secretada pela levedura.

2) Cópias extras do gene nativo STL1 de *S. cerevisiae*, simportador de glicerol nativo para a membrana plasmática foram introduzidas para aumentar a reabsorção de glicerol pela célula. Esta modificação objetiva a redução da concentração extracelular do glicerol, subproduto indesejável da fermentação. Nas linhagens M32292, M32376 e M32379 há 2 cópias por cromossomo (6 cópias adicionais às 3 cópias nativas) .

Todos os elementos reguladores (promotores / terminadores) para os genes introduzidos são provenientes de *S. cerevisiae*.

Maiores informações estão descritas às páginas 16 a 20 do documento confidencial.

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

Informação confidencial

Os detalhes da engenharia genética das linhagens M32292, M32376 e M32379 são descritos às páginas 20 a 24 do documento confidencial.

Foi incluída a genotipagem (Figura 6 - página 24), que apresenta uma imagem em gel de produtos de PCR de genotipados para as linhagens transformadas e a parental. O marcador de massa molecular de DNA (DNA ladder New England Biolabs 1KB, #N3232L) foi usado na imagem de gel com os tamanhos de fragmentos indicados. O DNA foi gerado por amplificação por PCR usando Phusion DNA polimerase, e os fragmentos de DNA foram extraídos em gel usando NucleoSpin Gel e kit PCR Clean-up de Macherey-Nagel. Os fragmentos de DNA e plasmídeos foram transformados em células de levedura usando procedimentos de eletroporação padrão. As colônias transformadas (transformantes) foram então semeadas nas placas de seleção indicadas para uma dada integração.

Os mapas dos plasmídeos são apresentados à página 22 e um esquema da construção genética, à página 23, do documento confidencial.

5. Classe 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 gene metabólico com integrações heterólogas de *Zymomonas mobilis* e integrações homólogas de *Saccharomyces cerevisiae*, cópias adicionais 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.

A fim de criar integrações estáveis, o sistema gênico de repetições palindrômicas curtas regularmente inter espaçadas agrupadas (CRISPR)/associado a CRISPR (Cas) foi usado para integrar com precisão no locus PDC1. A técnica CRISPR/Cas9 é utilizada em uma ampla gama de organismos para efetuar modificações genéticas precisas com efeitos

colaterais mínimos. Baseia-se no uso da nuclease Cas9 para clivar o DNA genômico de cadeia dupla em locais definidos por um RNA guiado (gRNA), que contém uma sequência de direcionamento de aproximadamente 20 nucleotídeos, que devem ser homólogos ao local do corte pretendido. Os requisitos para a sequência de RNA guiado são flexíveis o suficiente para que seja quase sempre possível encontrar uma sequência alvo original na região genômica a ser modificada, impedindo assim que o Cas9 corte outra parte do genoma.

Além da endonuclease Cas9, que é mais comumente conhecida, abordagens alternativas de engenharia demonstraram funcionar para uso em engenharia, como Cas12A/Cpf1, Cas13a/C2c2 e Cas13b 81. Em 2017, a empresa Inscripta desenvolveu uma nova RNA-nuclease mais semelhante à Cpf1 que foi isolada de *Eubacterium rectale* e denotada como MAD7, que foi usada na edição genética das linhagens M32292, M32376 e M32379.

Resumidamente, a nuclease MAD7 de *Eubacterium rectale* foi otimizada por códon para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* e clonada em um vetor Cen/pBR322 resistente a G418/AMP sob controle do promotor TEF1 e do terminador CYC1 (pMU5130). Além disso, timidina quinase de herpesvírus humano foi incluída para uso em seleção negativa e cura de plasmídeo por seleção de 5- fluoro-desoxiuridina (FUDR). MAD7 não requer o uso de um tracrRNA e a sequência de gRNA é composta por uma repetição 5' de 35 nucleotídeos e um espaçador específico de alvo de 21 nucleotídeos diretamente adjacente a um sítio de reconhecimento PAM de 4 nucleotídeos rico em T. A porção estrutural do gRNA MAD7 foi clonada em um vetor shuttle 2um/pBR322 resistente a NAT/AMP sob o controle do promotor de RNA polimerase III SNR52 e o terminador do tRNA de tirosina SUP4 (pMU5102). O uso de elementos reguladores Pol III é essencial para evitar o processamento de mRNA que o tornaria não funcional. pMU5102 serve como um vetor principal para inserção da sequência alvo de gRNA específica de 21 nucleotídeos para deleção de gene de interesse. O software Geneious foi usado para selecionar o local de corte de destino PAM "TTTV" para PDC1 nativo sem sites fora do alvo. Esta sequência de 21 nucleótidos foi clonada em pMU5102 para criar o plasmídeo gRNA pMU5352. O uso desta tecnologia aumenta significativamente a eficiência da engenharia de linhagens, permitindo a integração perfeita de construções de genes e deleções de genes nativos sem a necessidade de locais de pré-marcação usando cassetes tradicionais de seleção positiva/negativa.

As transformações de *S. cerevisiae* foram realizadas com o plasmídeo endonuclease pMU5130 Mad7, o plasmídeo pMU5352 PDC1 gRNA e os novos fragmentos de DNA. A endonuclease Mad7 é direcionada pelo RNA guia PDC1 para cortar no locus PDC1 em cada cromossomo. Uma vez que o

corde tenha sido feito na sequência de DNA alvo pelo complexo MAD7/gRNA, a célula não sobreviverá a menos que a quebra tenha sido reparada. Em *S. cerevisiae*, o mecanismo primário (e altamente eficaz) de reparo do DNA é a recombinação homóloga. Como resultado, a quebra pode ser facilmente reparada pela introdução de um cassete de DNA com sequência que abrange a quebra de DNA induzida por MAD7 (Figura 7 - página 29 do documento confidencial). A homologia entre os flancos do cassete e o DNA genômico permite a recombinação homóloga, permitindo tanto o direcionamento quanto a integração do cassete. Se o cassete de integração não contiver a sequência alvo original do gRNA, a inserção do cassete impedirá que MAD7 clive o DNA genômico novamente. Os transformantes bem sucedidos podem, portanto, ser isolados selecionando a presença dos plasmídeos que fornecem os componentes MAD7 e gRNA. Somente as células que carregam os plasmídeos e eliminaram a sequência alvo original pela inserção do cassete de integração poderão crescer e formar colônias em placas seletivas. Após esta etapa de seleção, os plasmídeos MAD7 e gRNA podem ser curados rapidamente cultivando as células sob condições não seletivas e confirmando sua perda por crescimento em FUDR como mencionado acima para confirmar a perda do DNA do plasmídeo. A confirmação da remoção do marcador antibiótico foi avaliada por PCR e placas de diluição em meio seletivo.

Transformações

Para a realização das transformações o DNA recombinante foi transferido para a linhagem por eletroporação. Para conseguir células competentes, uma cultura inicial foi preparada por inoculação em 5 mL de YPD e cultivada overnight. No dia seguinte, 2 mL da cultura inicial foram inoculados em 48 mL de YPD e agitados a 175 rpm a 300C por 3 horas, ponto em que a cultura atingiu uma densidade óptica (D.O.) de ~ 1,4. Então, as células foram colhidas por centrifugação a 200-4000 rpm durante 1-2 minutos e após, o sedimento celular foi lavado duas vezes com 10 mL de água deionizada esterilizada. Estas células lavadas foram então diluídas em 800 µL de acetato de lítio (LiOAc) 100 mM (em tampão TE 1X) / ditioneitol (DTT) 25 mM e incubadas a 35 °C durante 45 minutos. Após esta incubação, as células foram lavadas uma vez em 1 mL de água deionizada e uma vez em tampão de eletroporação (sorbitol 1M). Finalmente, as células competentes foram ressuscitadas em 600 a 700 µL de tampão de eletroporação e reservadas em gelo até o uso. A eletroporação foi conduzida adicionando 100 µL de células competentes a 300-500ng µg de cassetes purificados em gel. Esta suspensão foi adicionada a cubetas de eletroporação de 2 mm e em banho de gelo por 2 minutos. As cubetas foram, então, pulsadas usando um BioRad GenPulser Xcell ajustado para 2,5 kV, 200 OHMS, 25 µF. Após a

eletroporação, as células se recuperaram em meio YPDS (YPD / 1M sorbitol) overnight e, em seguida, foram plaqueadas sólido em meio seletivo.

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

Informação confidencial

Capacidade de melhorar a taxa de glicólise através do aumento da conversão de piruvato em acetaldeído (PDC heterólogo)

Saccharomyces cerevisiae contém genes PDC nativos que têm sido bem caracterizados. Em condições anaeróbicas em leveduras, particularmente *Saccharomyces*, PDC está envolvido na fermentação para produzir etanol. Nas linhagens M32292, M32376 e M32379 o gene PDC de *Zymomonas mobilis* substitui o gene nativo PDC1 de *S. cerevisiae*, para melhorar a taxa de conversão de piruvato em acetaldeído + CO₂.

Nomenclatura IUB: piruvato descarboxilase

Outro(s) nome(s): α -carboxilase (ambíguo); descarboxilase pirúvica; α -cetoácido carboxilase

Nome sistemático: 2-oxo-ácido carboxi-liase (formador de aldeído)

IUB/CAS: 4.1.1.1/9001-04-1

Reação: 2-oxo carboxilato => um aldeído + CO₂; permite que *S. cerevisiae* modificada produza eficientemente acetaldeído a partir de piruvato

As linhagens M32292, M32376 e M32379 expressam 3 cópias (1 por cromossomo) do gene PDC de *Zymomonas mobilis* codon otimizado para expressão em *S. cerevisiae*. A piruvato descarboxilase produzida por *S. cerevisiae* geneticamente modificada não é substancialmente diferente das formas existentes e, portanto, é segura para o uso pretendido.

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

Informação confidencial

A linhagens são facilmente identificáveis por reação em cadeia da polimerase, PCR, de diagnóstico para amplificação das sequências únicas de genes inseridos e que são encontrados apenas nas linhagens modificadas, mas não na linhagem parental ou outros microrganismos. Sequências de

iniciadores primers específicos e que podem ser usados para este teste estão disponíveis.

9. Avaliação de efeitos pleiotrópicos e epistáticos dos genes inseridos através de pelo menos um caractere fenotípico e um bioquímico, justificando a escolha dos caracteres selecionados

Não são esperados efeitos pleiotrópicos e epistáticos nas linhagens M32292, M32376 e M32379 de *S. cerevisiae*.

Maiores informações estão descritas às páginas 31 e 32 do documento confidencial.

10. A possibilidade de haver interações com efeitos adversos, quando dois ou mais genes forem introduzidos no mesmo MGM por técnicas de ADN recombinante, considerando a função dos genes e o potencial de interação entre os respectivos produtos de expressão

As análises conduzidas para caracterização genética das linhagens M32292, M32376 e M32379 e a demonstração de sua estabilidade genética e fenotípica não antecipam qualquer indício de presença de interações adversas fora do objetivo pretendido. As modificações genéticas conduzidas nas linhagens M32292, M32376 e M32379 usaram técnicas que geram integrações estáveis e fáceis de caracterizar.

Maiores informações estão descritas na página 32 do documento confidencial.

11. O vetor utilizado na clonagem e seu espectro de hospedeiros, informando se este irá se replicar e permanecer no MGM.

Informação confidencial

As técnicas de modificação genética utilizadas para desenvolver as linhagens M32292, M32376 e M32379 de *S. cerevisiae* dependem da integração direcionada de cassetes no locus alvo no genoma da levedura, e a estratégia de engenharia empregada resulta em linhagens isentas de genes de resistência a antibióticos que são, portanto, sensíveis a antibióticos. Além disso, tdk foi usado como um marcador contra-seletivo em cada plasmídeo que foi introduzido transientemente em cada linhagem para permitir a remoção desse plasmídeo e para confirmar a ausência nas linhagens finais.

Como os marcadores antibióticos foram utilizados na engenharia das linhagens M32292, M32376 e M32379, foi realizado um PCR diagnóstico

para determinar a possível presença de elementos genéticos codificadores de ampicilina, nourseotricina (NAT) ou G418 nas linhagens finais de produção, utilizando o locus *fur1* nativo como um controle positivo para confirmar a qualidade do DNA. As linhagens M32292, M32376 e M32379 foram negativas para todos os marcadores de antibióticos, mostrando que estão livres de vetores.

Avaliação de Risco ao Meio Ambiente

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

Não se antecipa qualquer resistência à estresse abiótico.

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

As linhagens M32292, M32376 e M32379 não contêm genes de resistência a antibióticos.

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 de *S. cerevisiae* M32292, M32376 e M32379 tenham resultado em alterações significativas na capacidade de sobrevivência e dispersão com relação ao tipo selvagem.

Avaliação de Risco de Derivados de MGMS

A) Informações relativas ao derivado e ao MGM a partir do qual o derivado foi produzido

1. A identificação do derivado de MGM, objetivo e utilização

O derivado das linhagens M32292, M32376 e M32379 de *Saccharomyces cerevisiae* é o vinho destilado (vinhaça), que consiste principalmente da biomassa inativada (composta por células do OGM mortas) e nutrientes residuais que são completamente livre de células vivas ou DNA intacto, a qual se destina ao uso como ingrediente em ração animal.

2. A classificação taxonômica do MGM

As linhagens M32292, M32376 e M32379 são leveduras pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae* classificada cientificamente da seguinte forma: *Eukaryota Fungi Dikarya Ascomycota Saccharomycotina Saccharomycetes Saccharomycetales Saccharomycetaceae Saccharomyces Saccharomyces cerevisiae*

3. Os genes introduzidos no MGM do qual o derivado é oriundo; suas funções específicas e organismos de origem

Informação confidencial

As linhagens de M32292, M32376 e M32379 são derivadas de uma linhagem parental triploide de ocorrência natural e não-modificada, isolada de uma dorna de fermentação, que recebeu a designação interna de M17328 e apresentam as seguintes modificações:

- *Zymomonas mobilis* : doador do gene piruvato descarboxilase (ZmPDC) o qual foi sintetizado artificialmente com base na sequência WP_011241152 do organismo *Z. mobilis*. A enzima piruvato descarboxilase de *Z. mobilis* melhora a conversão de piruvato em acetaldeído em comparação com a PDC nativa de *S. cerevisiae*, que não é secretada pela levedura. *Z. mobilis* é uma bactéria de Classe de risco 1 que tem uma longa história de uso na fermentação de açúcares vegetais para produzir bebidas alcoólicas e é amplamente utilizada na produção em larga escala de bioetanol.

- *Saccharomyces cerevisiae*: organismo hospedeiro da linhagem, com modificações endógenas para superexpressão do simportador de glicerol via membrana STL1. Nas linhagens alvo deste dossiê , cópias extras do gene nativo STL1 de *S. cerevisiae*, simportador de glicerol nativo para a membrana plasmática foram introduzidas para aumentar a reabsorção de glicerol pela célula. Esta modificação objetiva a redução da concentração extracelular do glicerol, subproduto indesejável da fermentação. Nas linhagens M32292, M32376 e M32379 há 2 cópias por cromossomo (6 cópias adicionais às 3 cópias nativas). A *S. cerevisiae* é a espécie de organismo eucariótico mais conhecido e estudado no mundo, sendo modelo importante de estudo celular. Essa levedura, classe de risco 1, tem histórico de uso seguro por milhares de anos, de forma que várias agências regulatórias em todo o mundo a isentaram de restrições regulatórias . Descrições sobre o uso da *S. cerevisiae* para uso em alimentação humana são extensas além do microrganismo ser, também, aceito para diversos produtos destinados à alimentação animal.

4. A classificação de risco do MGM do qual o derivado é oriundo

Classe de risco 1

B) Avaliação de risco do derivado á 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. Seu uso seguro é verificado por vários órgãos reguladores. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) isenta de registro o levedo de cerveja na forma de pó de *S. cerevisiae* da Farmacopeia Brasileira, sendo este amplamente encontrado em farmácias e drogarias com venda livre, além da beta-glucana de *S. cerevisiae* ser registrada para uso humano.

No Ministério da Agricultura (MAPA), diversas bebidas fermentadas com *S. cerevisiae* são registradas, tais como vinhos e cervejas, além de aditivos para alimentação animal proveniente de desta espécie de levedura³⁸. No país, a levedura excedente do processo de produção de etanol combustível é seca e vendida para composição de produtos humanos e animais, com aproximadamente 90.000 toneladas usadas anualmente, processadas na forma de extratos e parede celular. Os extratos de levedura são usados pela indústria alimentícia para substituir o sal e fornecer sabor e aroma aos alimentos. Portanto, as linhagens brasileiras de etanol mostram-se rotineiramente seguras para consumo humano e animal.

A Comissão Técnica Nacional de Biosegurança (CTNBio) emitiu parecer, atestando a segurança para linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas: elas foram aprovadas para a produção comercial a partir de

cana de açúcar e de milho, para fermentação de açúcares de lignocelulose, além de linhagens da Lallemand para produção mais eficiente de etanol.

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 vinho clarificado da centrifuga, que também contém algum excesso de levedura, será passado para a destilação, a fim de separar o etanol da água, e onde as condições de alta temperatura rapidamente inativam as linhagens M32292, M32376 e M32379. A inativação das linhagens por calor e branqueamento já foi avaliada e considerada idêntica às diversas linhagens da Lallemand já aprovadas pela CTNBio, inclusive as auclonadas e à assim como a cepa Pe-2 habitualmente utilizada e comercialmente disponível.

Dessa forma, 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.

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

Informação confidencial

Não se aplica.

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

Informação confidencial

A inativação da levedura em escala industrial é tipicamente conseguida utilizando calor ou branqueamento. A inativação das leveduras M32292, M32376 e M32379 por calor e branqueamento já foi avaliada e considerada idêntica à sua parental M17328, assim como a estirpe Pe-2 habitualmente utilizada e comercialmente disponível.

C) Avaliação de risco para o meio ambiente

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

As linhagens M32292, M32376 e M32379 não apresentam nenhuma nova proteína na história alimentar.

Plano de Monitoramento Pós-Liberação Comercial

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379 em questão são consideradas Classe de Risco 1, ou seja, de baixo risco individual e baixo risco para a coletividade, de acordo com a Resolução Normativa Nº 2 de 27 de novembro de 2006, alterada pela Resolução Normativa CTNBio Nº 18, de 23 de março de 2018 e pela Resolução Normativa Nº 34, de 05 de Agosto de 2021, a qual "Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção", da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio).

Informação confidencial

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 M32292, M32376 e M32379 causem quaisquer efeitos adversos em comparação ao organismo não modificado geneticamente.

O processo de uso comercial das linhagens M32292, M32376 e M32379 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 inclui tratamento térmico que inativa todas as células viáveis; após a secagem, a biomassa é completamente livre de células vivas ou DNA intacto.

A Lallemand propõe o seguinte plano de monitoramento geral pós-liberação comercial das linhagens M32292, M32376 e M32379:

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 dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379, a serem utilizados na produção de etanol.

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** dos microrganismos *Saccharomyces cerevisiae* linhagens M32292, M32376 e M32379 Geneticamente Modificada.

Dr. Hilton Thadeu Zarate do Couto
Membro CTNBio