

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E
COMUNICAÇÕES

PARECER TÉCNICO 5904/2018

Processo: 01250.011076/2018-19

Data de Protocolo: 01/03/2018

Requerente: Globalyeast JV Co Brasil S.A

CNPJ: 19.687.271/0001-95

Endereço: Praia de Botafogo, 228, 12º Andar, sala 1201 D – Bairro Botafogo/RJ

Reunião: 213ª. Reunião Ordinária, ocorrida em 07/06/2018

Decisão: DEFERIDO.

Assunto: Solicitação de consulta a CTNBio para a avaliação da levedura “Excellomol 4.0” (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), se com base na Resolução Normativa nº 16 da CTNBio, a regulamentação de biossegurança nos termos da Lei 1.105 de 2005, se aplica ou não ao produto final.

Fundamentação Técnica:

A requerente submete consulta para CTNBio, frente ao fato de que foi desenvolvida uma levedura *S. cerevisiae*, para ser amplamente empregada em processos de produção de bioetanol, utilizando altas concentrações de melaço de cana como único substrato fermentativo. Esta levedura, denominada “*Excellomol 4.0*” visa obter, nos processos industriais de fermentação, maiores concentrações finais de etanol, reduzindo as concentrações de glicerol, comparativamente as quantidades normalmente obtidas dos dois compostos.

No processo inicial de desenvolvimento da levedura em análise, o genoma de três cepas foi combinado por cruzamento tradicional/melhoramento clássico (metodologia descrita em detalhe no processo) resultando em uma cepa (“*Excellomol*”) com uma capacidade fermentativa superior quando comparado as suas cepas parentes. Em seguida, o desempenho de fermentação do melaço foi melhorado ainda mais, redirecionando o fluxo de carbono da produção de

glicerol e biomassa para a produção de etanol, resultando na cepa “*Excellomol 4.0*”, com um aumento no teor final de etanol. A redução da produção de glicerol e biomassa foi conseguida através da edição genômica de precisão utilizando variante nativo de um gene identificado na cepa natural de *S. cerevisiae*, CBS 6412, isolada da fabricação de saquê (*CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center*, Países Baixos). A cepa CBS 6412 é caracterizada pela baixa proporção de glicerol em relação à produção de etanol durante a fermentação. O gene editado codifica um sensor osmótico; parte de um transdutor de sinal de dois componentes que media a resposta ao estresse osmótico através de um mecanismo de fosforilação;

Processo Genéticos

O processo de melhoramento molecular da levedura deu-se pela introdução precisa de alguns polimorfismos de nucleotídeo único que ocorrem naturalmente na cepa 6412 e em outras cepas de *S. cerevisiae*. As metodologias utilizadas para o desenvolvimento da cepa “*Excellomol 4.0*” diferem da estratégia de transgenia, por resultar na ausência de DNA/RNA recombinante. A introdução dos polimorfismos de DNA feitos na cepa “*Excellomol 4.0*” poderiam ter sido obtidos pelo melhoramento clássico, ou mesmo por mutações naturais que podem ser induzidos por fatores externos diversos como, por exemplo, exposição à luz UV e/ou substâncias químicas, ou mesmo por erros durante a replicação de DNA. Neste caso, o conhecimento da genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos primeiros micro-organismos a serem estudados cientificamente, e o primeiro eucariota a ter o genoma completamente sequenciado (Goffeau et al., 1996; Etschmann et al., 2002), permitiu a identificação exata dos genes envolvidos no processo de fermentação de álcool. Com a utilização das técnicas de engenharia de precisão mais recentes, foi possível, alterar as sequências de DNA destes genes, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente, só que com uma precisão muito maior. O mesmo resultado poderia ser obtido por melhoramento clássico, ou mesmo por fatores externos como descrito acima, só que num período de tempo muito maior, e sem a mesma precisão. Para produção da cepa “*Excellomol 4.0*” foi utilizado o sistema CRISPR-Cas9, um mecanismo de edição de DNA que ocorre naturalmente em bactérias. Trata-se de um sistema de edição do genoma que permite a realização de modificações genômicas de maneira fácil e precisa, e sem presença de DNA de outra espécie no produto final (Sontheimer e Marraffini 2010; Makarova et al., 2011; DiCarlo et al 2013, Mali et al. 2013; Khatodia et al., 2016). A enzima Cas9 é uma endonuclease guiada por RNA que cliva a dupla-fita do DNA em locais-alvo específicos, ativando assim a maquinaria de reparo do DNA. Na ausência de um DNA de reparo homólogo, a quebra da dupla-fita pode levar a mutações (inserções ou deleções) através da via de reparo de junção não

homóloga. Este sistema tem sido nomeado como mutagênese sítio dirigida tipo 1 (*Site-directed mutagenesis type 1*; SDN1). Alternativamente, quando é fornecido um modelo de reparo (DNA doador), podem ser feitas mutações precisas ou inserções de fragmentos de DNA através de recombinação homóloga. Quando ocorre a substituição somente parcial da sequência de DNA de um elemento gênico (CDS, promotor, etc) é considerado como SDN2, ou quando ocorre a substituição completa de um elemento gênico funcional por inteiro (promotor, CDS, terminador, etc), tem sido considerado como uma mutagênese sítio-dirigida tipo 3 (SDN3).

Modificações Genéticas

- A. Cruzamento tradicional (melhoramento genético clássico) a fim de combinar as características superiores em uma única Cepa, “*Excellomol*”.

O primeiro passo para a construção da cepa “*Excellomol 4.0*” foi a obtenção da cepa “*Excellomol*” onde a triagem de uma grande coleção de cepas naturais de *S. cerevisiae* foi feita buscando-se aquelas que apresentavam melhor desempenho na fermentação em altas concentrações de melaço como único substrato. No total, foram selecionadas três cepas industriais que mostraram um desempenho de fermentação superior em termos de tolerância ao melaço (concomitante com uma alta taxa de fermentação) ou tolerância ao etanol (concomitante com alta produção de etanol). As três cepas foram então combinadas/cruzadas por melhoramento clássico conforme descrito em detalhe na solicitação da empresa requerente originando a cepa “*Excellomol*”.

- B. Edição Gênica na cepa “*Excellomol*” para obtenção da cepa “*Excellomol 4.0*”.

Para produção da cepa “*Excellomol 4.0*” o alelo de interesse foi trocado na cepa “*Excellomol*” utilizando-se a técnica CRISPR-Cas9. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos dos alelos da “*Excellomol*” e de sua variante natural, cepa CBS 6412, foram fornecidos pela requerente e apresentados no processo em detalhe. A cepa “*Excellomol*” foi inicialmente transformada com o plasmídeo pTEF-Cas9-KanMX, que permite a expressão do gene CAS9 sob o controle do promotor TEF1. Os transformantes foram selecionados em meio sólido de glicose contendo geneticina. Para o gene de interesse, a cepa contendo o plasmídeo pTEF-Cas9-KanMX foi co-transformada com e um fragmento de DNA linear contendo a variante natural do alelo identificado na cepa CBS 6412.

Os plasmídeos que transcrevem RNA-guia são mostrados no processo apresentado pela requerente. Os iniciadores utilizados para a amplificação do DNA doador linear a partir da estirpe 26B (segregante haploide da estirpe CBS 6412) também foram fornecidos pela requerente. A levedura obtida após a troca do alelo de interesse é referida como “*Excellomol 4.0*”. A cepa não apresentou crescimento em meio sólido de glicose contendo geneticina ou higromicina e também não apresentou integração genômica de elementos genéticos vindos dos plasmídeos utilizados conforme descrito em detalhe no processo.

Parecer final:

A CTNBio acolhe a solicitação da requerente e considera a levedura “*Excellomol 4.0*” igual as leveduras convencionais no âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, e com base na Resolução Normativa nº16 da CTNBio, de 15 de Janeiro de 2018. Constata-se que a Cepa “*Excellomol 4.0*” de *S. cerevisiae*, foi obtida por Técnicas de Melhoramento Clássico e Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), onde possui mutações sítio dirigidas, que geraram alteração da função gênica do gene nativo aumentando a eficiência na produção de etanol. A edição genômica de precisão foi realizada utilizando-se o sistema CRISPR/Cas9, que permitiu as modificações de forma precisa e sem a inclusão de DNA de outras espécies no produto final. A aplicação da técnica na levedura *Excellomol* resultou em uma cepa que possui o mesmo número de cópias do gene-alvo (isto é, duas cópias) presentes no mesmo local do genoma onde o gene original do tipo selvagem ocorre. Nenhuma outra região do genoma foi manipulada, nenhuma copia adicional foi introduzida e nenhum DNA heterólogo foi inserido. Ausência de efeitos Off-Target foram avaliados *in silico* pelos programas *e-crisp* (http://www.ecrisp.org/E-CRISP/reannotate_crispr.html) e *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool* - <https://www.yeastgenome.org/blast-sgd>). Também, *in vivo*, após a substituição do alelo, a cepa “*Excellomol 4.0*” foi rigorosamente testada para o desempenho de propagação e fermentação e para a capacidade de floculação onde não foram detectados efeitos não intencionais. O efeito final da edição genética realizada na cepa *Excellomol* é a introdução de alguns polimorfismos pontuais no gene de interesse, polimorfismos estes que já ocorrem naturalmente na cepa CBS 6412 de *S. cerevisiae*, originalmente identificada na produção de Saquê. A correta introdução destes polimorfismos foi conferida por sequenciamento de DNA e os produtos (proteínas) da expressão do alelo originário da levedura “*Excellomol*” e de sua variante natural proveniente da levedura CBS 6412 é apresentado em detalhe no processo. O alinhamento das sequências de aminoácidos correspondentes ao alelo das cepas “*Excellomol*” e CBS6412 mostra duas mudanças de aminoácidos e uma

mudança de fase de leitura resultando em um códon de parada precoce. Estes polimorfismos de DNA editados na cepa “*Excellomol*”, que criaram a nova cepa “*Excellomol 4.0*”, poderiam ter sido obtidos pelo melhoramento clássico, ou mesmo por mutações naturais que podem ser induzidos por fatores externos diversos como, por exemplo, exposição à luz UV e/ou substâncias químicas, ou mesmo por erros durante a replicação de DNA. Neste caso, o conhecimento da genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos primeiros micro-organismos a serem estudados cientificamente, e o primeiro eucariota a ter o genoma completamente sequenciado (Goffeau et al., 1996; Etschmann et al., 2002), permitiu a identificação exata dos genes envolvidos no processo de fermentação de álcool. Com a utilização das técnicas de engenharia de precisão mais recentes, foi possível, alterar as sequências de DNA destes genes, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente, só que com uma precisão muito maior. O mesmo resultado poderia ser obtido por melhoramento clássico, ou mesmo por fatores externos como descrito acima, só que num período de tempo muito considerável, e sem a mesma precisão. Para produção da cepa “*Excellomol 4.0*” foi utilizado o sistema CRISPR-Cas9, um mecanismo de edição de DNA que ocorre naturalmente em bactérias. Trata-se de um sistema de edição do genoma que permite a realização de modificações genômicas de maneira fácil, precisa e sem cicatrizes. Como base no descrito neste parecer e no processo de consulta apresentado na CTNBio, conclui-se que esta levedura não é considerada um organismo geneticamente modificado, conforme os preceitos da Lei 11.105/05.

Referencias Bibliográficas Consultadas:

Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. FEMS Yeast Res, 8: 1155-63.

Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM (1997) Yeast as a model organism. Science, 277: 1259-60.

Chan RK, Otte CA (1982) Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. Mol Cell Biol, 2: 11-20.

Chen DC, Yang BC, Kuo TT (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. Curr Genet, 21: 83-84.

DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res, 41:4336-43.

- Etschmann MM, Bluemke W, Sell D, Schrader J (2002) Biotechnological production of 2- phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 1-8.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546: 547-63.
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT and Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 74: 2259-66.
- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 52: 536–553
- Hubmann G, Foulquié-Moreno MR, Nevoigt E, Duitama J, Meurens N, Pais TM, Mathé L, Saerens S, Nguyen HT, Swinnen S, Verstrepen KJ, Concilio L, de Troostembergh JC, Thevelein JM (2013a) Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering. *Metab Eng*, 17: 68-81.
- Hubmann G, Mathé L, Foulquié-Moreno MR, Duitama J, Nevoigt E, Thevelein JM (2013b) Identification of multiple interacting alleles conferring low glycerol and high ethanol yield in *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 6: 87-103.
- Hsu PD., Lander ES, Zhang F (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157: 1262-78.
- Huxley C, Green ED, Dunham I (1990) Rapid assessment of *Saccharomyces cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in Genetics*, 6: 236.14
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E (2012) A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816-21.
- Karathia H, Vilaprinyo E, Sorribas A, Alves R (2011) *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS One*, 6: e16015
- Khatodia S, Bhatotia K, Passricha N, Khurana SMP, Tuteja N (2016) The CRISPR/Cas genomeediting tool: Application in improvement of crops. *Frontiers in Plant Science*, 7: 506.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*, 9: 467-77.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339: 823-26.

Mortimer RK (2000) Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*, 10, 403-9.

Nevoigt E (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72: 379-412.

Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, 350: 3-41.

Sontheimer EJ, Marraffini LA (2010) Microbiology: Slicer for DNA. *Nature*, 468: 45-6.

Swinnen S, Schaerlaekens K, Pais T, Claesen J, Hubmann G, Yang Y, Demeke M, Foulquié-Moreno MR, Goovaerts A, Souvereys K, Clement L, Dumortier F, Thevelein JM (2012) Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence analysis. *Genome Res*, 22: 975-84.

Data: 08/06/2018

Maria Sueli Soares Felipe

Presidente da CTNBio