

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA
PARECER TÉCNICO Nº 7021/2020

Processo SEI nº: 01250.006695/2020-14

Processo sigiloso: 01250.007203/2020-08

Requerente: Lallemand Brasil Ltda.

CQB: 409/16

Endereço: Alameda A, Quadra CHC, Lote 186, Chácara São Pedro I. Aparecida de Goiânia. CEP 74.923-090. GO.

Assunto: Solicitação de parecer para Consulta sobre linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (M22993) melhorada com Técnicas Inovadoras de Melhoramento e Precisão.

Extrato Prévio: 6918/20, publicado no DOU em 18 de fevereiro de 2020.

Reunião: 233ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 05 de agosto de 2020.

Ementa: O Presidente da Comissão Interna de Biossegurança da Lallemand do Brasil Ltda., Dr. Rudhi Colombaroli Carneiro, solicita parecer técnico da CTNBio para Consulta sobre linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (M22993) melhorada com Técnicas Inovadoras de Melhoramento e Precisão. O processo será analisado de acordo com as normativas legais vigentes e um parecer deverá ser emitido.

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 12/2020/SEI-CTNBio – Membros** da Secretaria Executiva da CTNBio, a Presidente da CTNBio aprovou a solicitação de sigilo para as informações contidas nos "Cópia confidencial" do referido processo.

PARECER TÉCNICO (resposta)

A levedura *S. cerevisiae* é o principal organismo utilizado no mundo para produção de etanol para consumo humano, farmacêutico, doméstico, industrial e uso como combustível. A indústria brasileira de etanol combustível converte sacarose da cana-de-açúcar em etanol com rendimentos teóricos por volta de 92% de conversão. Como mais da metade do custo final do etanol de cana-de-açúcar deve-se ao custo da mesma, qualquer aumento nos rendimentos na produção de etanol a partir de cana-de-açúcar adiciona um ganho significativo na riqueza total da sociedade brasileira. Um aumento de 1% no rendimento de etanol aumenta em mais de 250 milhões de litros a quantidade de etanol produzido anualmente no Brasil a partir da mesma massa de cana. Uma engenharia genética mínima na levedura produtora de etanol

combustível pode levar a esse aumento na eficiência de fermentação. Também, e igualmente importante, aumentos no rendimento na conversão de sacarose em etanol trazem um ganho ao meio ambiente porque uma mesma quantidade de etanol pode ser produzida em uma menor área de plantio de cana-de-açúcar.

A linhagem M22993 de *S. cerevisiae* (objeto da presente consulta) tem como finalidade aumentar a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Esta linhagem foi preparada com o objetivo de (i) dar maior robustez aos processos industriais utilizando como parental uma linhagem com propriedades industriais mais robustas e (ii) proporcionar aumento na produção de etanol manipulando um gene da própria levedura *S. cerevisiae*. Nenhum desses genes ou seus produtos foram associados a efeitos adversos sobre animais, seres humanos ou meio ambiente, quer por observações quer pela elaboração de hipóteses teóricas.

A linhagem M22993 é auto-clonada, sendo derivada de uma levedura linhagem de *S. cerevisiae* (M21799) robusta, não-modificada, isolada de uma usina de etanol combustível e escolhida por sua tolerância às condições de alta concentração de etanol e resistir à determinadas condições de lavagem ácida. O isolamento da linhagem parental foi muito semelhante ao isolamento da levedura Pe-2, que é a parental de linhagens auto-clonadas previamente aprovadas pela CTNBio e classificadas como não OGM (M10682, M15980, M18447 e M20544) e também parental de algumas linhagens modificadas geneticamente (linhagem da Amyris para farneseno), bem como de SA-1, BG1, Cat-1, FT858 e Fermell, todas linhagens leveduras atualmente comercializadas e utilizadas amplamente no Brasil.

Estudos relativos a testes de toxicidade aguda e subaguda de hidrolisado *Saccharomyces cerevisiae*, mostram que toxicidade dessa levedura é extremamente baixa e fornecem suporte adicional de segurança quanto ao uso de levedura como um agente probiótico. Isto está em consonância com o conhecimento atual de que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é não-patogênica e não-tóxica. De acordo com a Lei de Biossegurança 11.105 / 2005 e a Instrução Normativa CTNBio número 2, a classificação de risco da levedura M22993 é classe de risco 1.

A documentação entregue à CTNBio apresenta informações sobre todas as sequências nucleotídicas envolvidas, vetores e marcadores utilizados, bem como dos métodos utilizados e que são necessárias para analisar a linhagem de levedura M22993 em função da consulta que a requerente faz. A CTNBio acatou o pedido para que essas informações sejam classificadas como confidenciais. Para atender o requisito de confidencialidade, esse parecer tem duas partes, uma parte que não traz qualquer informação aceita como confidencial e outra, destacada em **negrito**, que apresenta algumas dessas

informações e também informações que, dado o conhecimento atual, permitem inferir com facilidade quais são as informações classificadas como confidenciais.

As técnicas de modificação genética utilizadas para desenvolver a linhagem M22993 são as mesmas utilizadas para a geração das linhagens M10682, M15980, M18447 e M20544 auto-clonadas e classificadas como não-OGM pela CTNBio. Essas técnicas tiveram como base a integração direta do cassete genético em cada cópia do cromossomo. A linhagem M22993 apresenta integrações estáveis e fáceis de caracterizar, sem quaisquer modificações genéticas provenientes da inclusão de genes heterólogos, segmentos de plasmídeos, segmentos de outros vetores ou DNA sintético. A abordagem usada de integração direcionada permitiu criar linhagens com eventos de integração que são estáveis e fáceis de caracterizar, como é o caso da levedura objeto da presente solicitação. A integração cromossômica, por sua própria natureza, reduz a probabilidade de qualquer mobilização e transferência do DNA para outros organismos da mesma espécie e de espécie diferente, além de melhorar a estabilidade das linhagens em relação a outras técnicas de produção de novas linhagens.

A linhagem auto clonada M22993 apresenta modificações que melhoram sua capacidade para produzir etanol durante a fermentação. Todas as modificações feitas na linhagem envolveram genes nativos de leveduras de modo que o organismo M22993 não possui nenhum gene, segmento de gene de qualquer outra espécie ou mesmo segmentos de DNA sintéticos. A estabilidade da linhagem foi avaliada ao longo de várias gerações mostrando fenótipo idêntico ao da M22993 original.

A possibilidade de eventuais efeitos não intencionais foi avaliada através da realização da caracterização fenotípica da linhagem, inclusive análises de crescimento e fermentação utilizando diversos açúcares como fonte de carbono e agentes inativantes. Em todos os testes a linhagem M22993 apresentou o mesmo comportamento que a linhagem parental.

As informações e referências científicas apresentadas no documento, especificamente, aquelas relativas às modificações introduzidas na linhagem M22993, reforçam a conclusão inequívoca de que essa linhagem é semelhante às presentes naturalmente em várias das linhagens utilizadas para a produção de etanol no Brasil.

A busca na literatura científica revela que nenhum desses genes ou seus produtos, que também estão presentes nas leveduras naturais, foi associado a qualquer efeito adverso sobre animais, seres humanos ou meio ambiente, quer por meio de observações quer pela formulação de hipótese teórica.

A linhagem M22993 não contém qualquer sequência de DNA que não seja de *S. cerevisiae*, portanto, não contém qualquer sequência dos marcadores de seleção utilizados na sua criação. A documentação apresentada inclui dados experimentais que suportam essa conclusão. Também são apresentados resultados de ensaios funcionais mostrando que o comportamento da linhagem M22993, frente aos marcadores de seleção, é semelhante à linhagem parental. Ademais, são apresentados resultados de análises moleculares mostrando que a linhagem M22993 não possui qualquer segmento de DNA remanescente devido à utilização de Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão. Ainda, a análise da sequência completa do genoma confirma a ausência de qualquer segmento de DNA estranho. A falta de plasmídeos, fragmentos de plasmídeos ou outros elementos gênicos faz com que a linhagem M22993 não possua, em relação à levedura parental e a leveduras naturais, capacidade aumentada para transferir DNA para qualquer outra espécie ou mesmo outros espécimes de *S. cerevisiae*.

É importante considerar que os polimorfismos de DNA editados na linhagem M22993 poderiam ter sido obtidos por melhoramento clássico ou mesmo por mutações naturais, que podem ser induzidas por fatores externos diversos. O conhecimento da genética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos microrganismos com maior conhecimento científico acumulado e o primeiro eucariota a ter a sequência do seu genoma completamente conhecida permitiu a identificação exata dos genes envolvidos no processo de fermentação de sacarose a álcool. Com a utilização de técnicas de precisão mais recentes, foi possível alterar genes que codificam para proteínas envolvidas nesse metabolismo, de forma semelhante ao que ocorre naturalmente, mas com uma precisão muito maior. O mesmo resultado poderia ser obtido por técnicas de melhoramento clássico, ou mesmo por ação de fatores externos, embora levando um período de tempo muito maior e com um grau de precisão muito menor.

Os dados contidos nas informações apresentadas pela solicitante mostram claramente que não há qualquer segmento de DNA presente na linhagem M22993 que não tenha se originado exclusivamente de *S. cerevisiae*. A análise do conjunto de dados e análises levam a conclusão de que a linhagem M22993 não é transgênica, mas um microrganismo modificado por "auto-clonagem" de genes da própria *S. cerevisiae*, portanto não pode ser considerado um OGM, de acordo com os seguintes itens da RN16: **I (produto com ausência comprovada de ADN/ARN recombinante, obtido por técnica que emprega OGM como parental); II (produto obtido por técnica que introduz mutações sítio dirigidas, gerando ganho ou perda de função gênica, com a ausência comprovada de ADN/ARN recombinante no produto; e IV (produto obtido por técnica onde existe a expressão, temporária ou permanente, de moléculas de ADN/ARN recombinante, sem que haja a presença ou introgressão dessas moléculas no produto).**

Portanto, a linhagem de *S. cerevisiae* M22993 foi obtida por Técnicas de Melhoramento Clássico e Técnicas Inovadoras de Melhoramento de Precisão (TIMPs), e possui mutações sítio dirigidas e deleção limpa e integração de genes nativos. A genotipagem por técnica de PCR confirmou que a linhagem contém a deleção apropriada e não possui a adição de qualquer segmento de DNA residual quer de *Saccharomyces*, *quer de qualquer outra espécie ou mesmo de DNA sintético*. Assim, concluí-se que nenhuma outra região do genoma foi manipulada e nenhum DNA heterólogo foi inserido. Assim, a CTNBio acolhe a solicitação da requerente e considera que a levedura M22993 é igual às leveduras convencionais no âmbito das competências do art. 14 da Lei 11.105/05, e com base na Resolução Normativa número 16.

Dr. Paulo Augusto Vianna Barroso
Presidente da CTNBio