



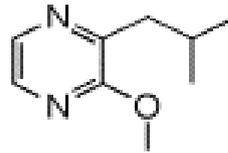
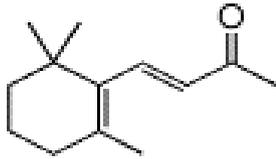
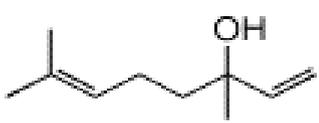
# Producción de Aromas y Sabores por Fermentación



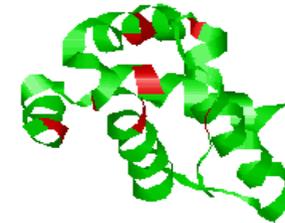
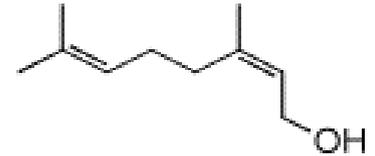
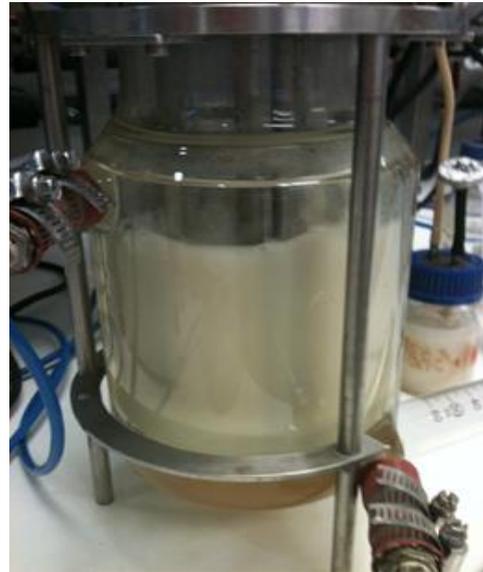
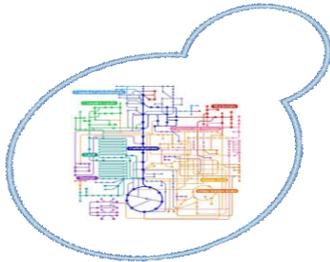
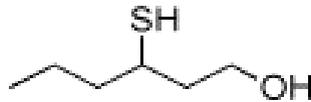
Eduardo Agosin

Centro de Aromas y Sabores, DICTUC; y

Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, CHILE



Aromas



Endulzantes





# Contexto



- Distintos compuestos químicos son empleados como **ingredientes aromáticos** y **fragancias** en varios nichos de mercado , incluyendo:



**Cosméticos**



**Productos de limpieza**



**Bebidas**

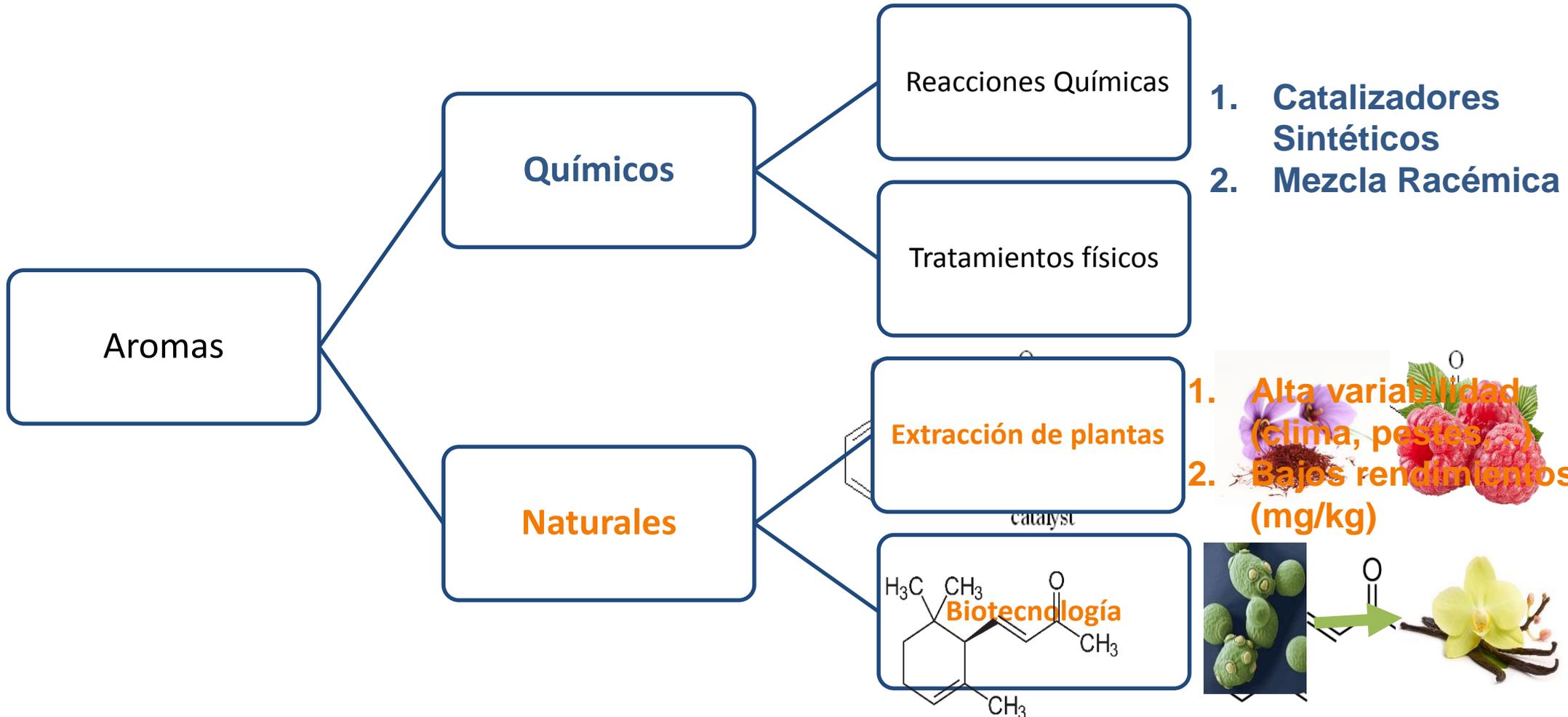


**Alimentos envasados**

- El mercado de F&F alcanzó **US\$ 24.700 millones** en 2015, con cerca de **4% crecimiento anual.**



# Aromas Químicos vs Naturales





# Los Consumidores prefieren ingredientes naturales



Nestlé USA Commits to Removing Artificial Flavors and FDA-Certified Colors from All Nestlé Chocolate Candy by the End of 2015

To Press Releases list

GLENDALE, Calif., Feb 17, 2015

*First Major U.S. Candy Manufacturer to Make This Commitment*

Nestlé USA announced today its commitment to removing artificial flavors and FDA-certified colors, like Red 40 and Yellow 5, from all of its chocolate candy products. By the end of 2015, more than 250 products and 10 brands including NESTLÉ® BUTTERFINGER®, CRUNCH® and BARRY RUTH® will be free of artificial





## La Biotecnología como fuente de aromas y sabores naturales



Paradigmáticos avances en ingeniería del metabolismo de factorías celulares microbianas, como:

*Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*,

permiten HOY que materias primas de bajo costo sean eficientemente bioconvertidas en compuestos químicos de valor, como pigmentos, proteínas, aromas y sabores.

# Marco legal de Aromas Naturales



## Unión Europea:

compuestos obtenidos mediante procesos **físicos, enzimáticos/microbianos** a partir de la transformación de **precursores aislados de la naturaleza**.

## USA:

la **naturalidad de las materias primas** define el status del producto final.

Así, los aromas y sabores obtenidos por fermentación son considerados naturales.....



# Compañías abocadas al desarrollo de bioaromas y biofragancias \*



**Table 1 Selected companies develop engineering biotech flavors and fragrances**

Company	Product areas	Partners
Allylix	Valencene	Acquired by Evolva in December 2014
Amyris	Artemisinin, undisclosed flavor and fragrance ingredients	Firmenich, IFF, Givaudan
Evolva	Vanillin, resveratrol, stevia	IFF, Cargill (Minneapolis)
Ginkgo BioWorks Boston	Rose	Robertet
Isobionics Geleen, The Netherlands	Valencene	DSM (Heerlen, The Netherlands)
Synthetic Genomics La Jolla, California	Omega-3 docosahexanoic acid (DHA) for animal feed	ADM (Chicago)

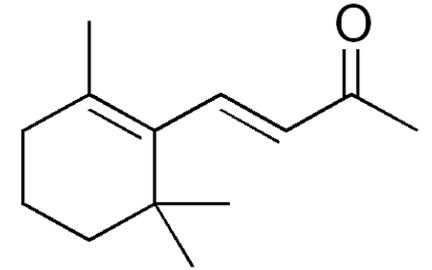
\*: from Nature Biotechnology, April 2015



# Producción sustentable de $\beta$ -ionona por expresión combinada de genes carotenogénicos y CCD1 en *Saccharomyces cerevisiae*



**J. López<sup>1</sup>, V. Cataldo<sup>1</sup>, M. Ibaceta<sup>1</sup>, F. Saitua<sup>1</sup>, Katy Kao<sup>2</sup>,  
& E. Agosin<sup>1,\*</sup>**



<sup>1</sup> Escuela de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile,  
& Centro de Aromas y Sabores, DICTUC, Santiago, CHILE

<sup>2</sup> Dept. of Chemical Engineering, Texas A&M University, USA





# Las Plantas son la principal fuente de ISOPRENOIDES



Mono, sesqui y di, triterpenos



Carotenoides



Norisoprenoidos

## TERPENOS

Defensa/  
comunicacion

Fragancias/  
Aromas

Fármacos

Biocombustibles

Background

Hyp./ obj.

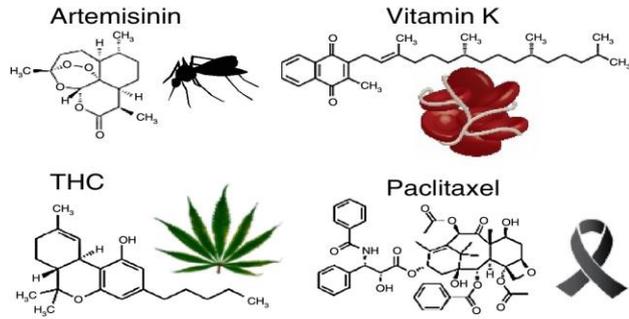
Metodología

Resultados

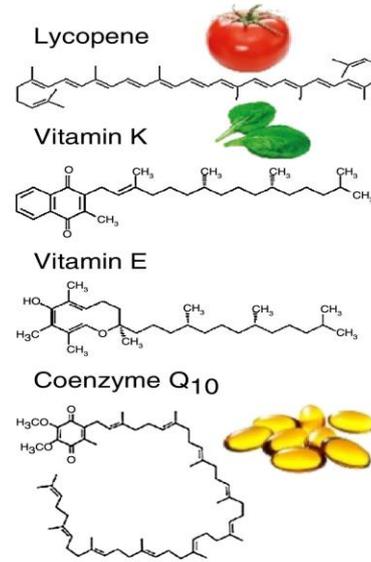
Conclusions

# Ejemplos de productos derivados de isoprenoides (terpenoides) con aplicaciones industriales.

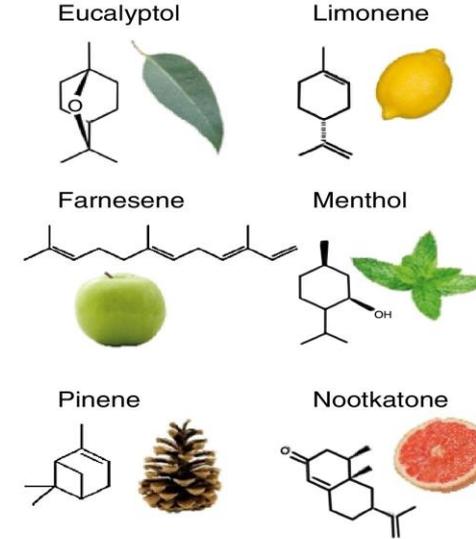
## Pharmaceuticals



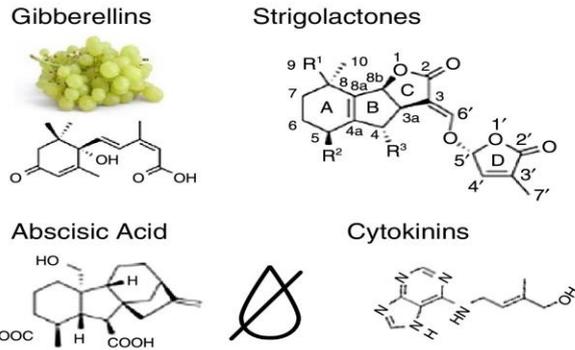
## Nutraceuticals



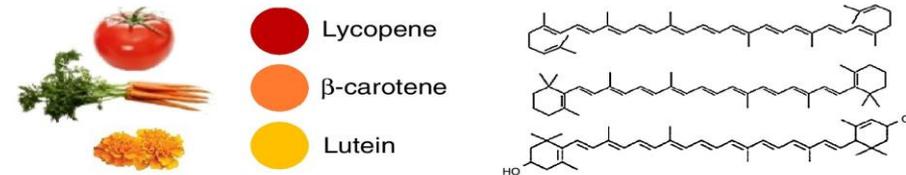
## Flavours/Fragrances



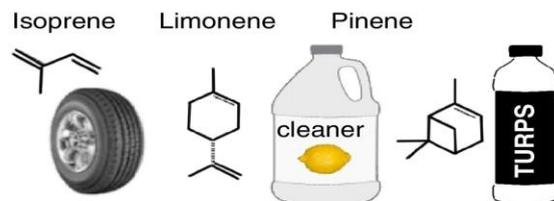
## Plant Hormones (Agriculture)



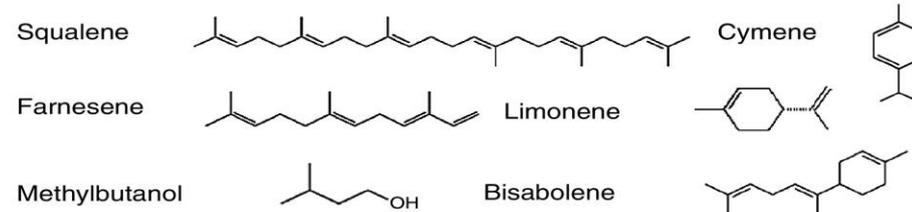
## Colourants



## Industrial chemicals



## Fuels/Fuel Additives





# Diversos norisoprenoides odorantes resultan de la degradación oxidativa de carotenoides



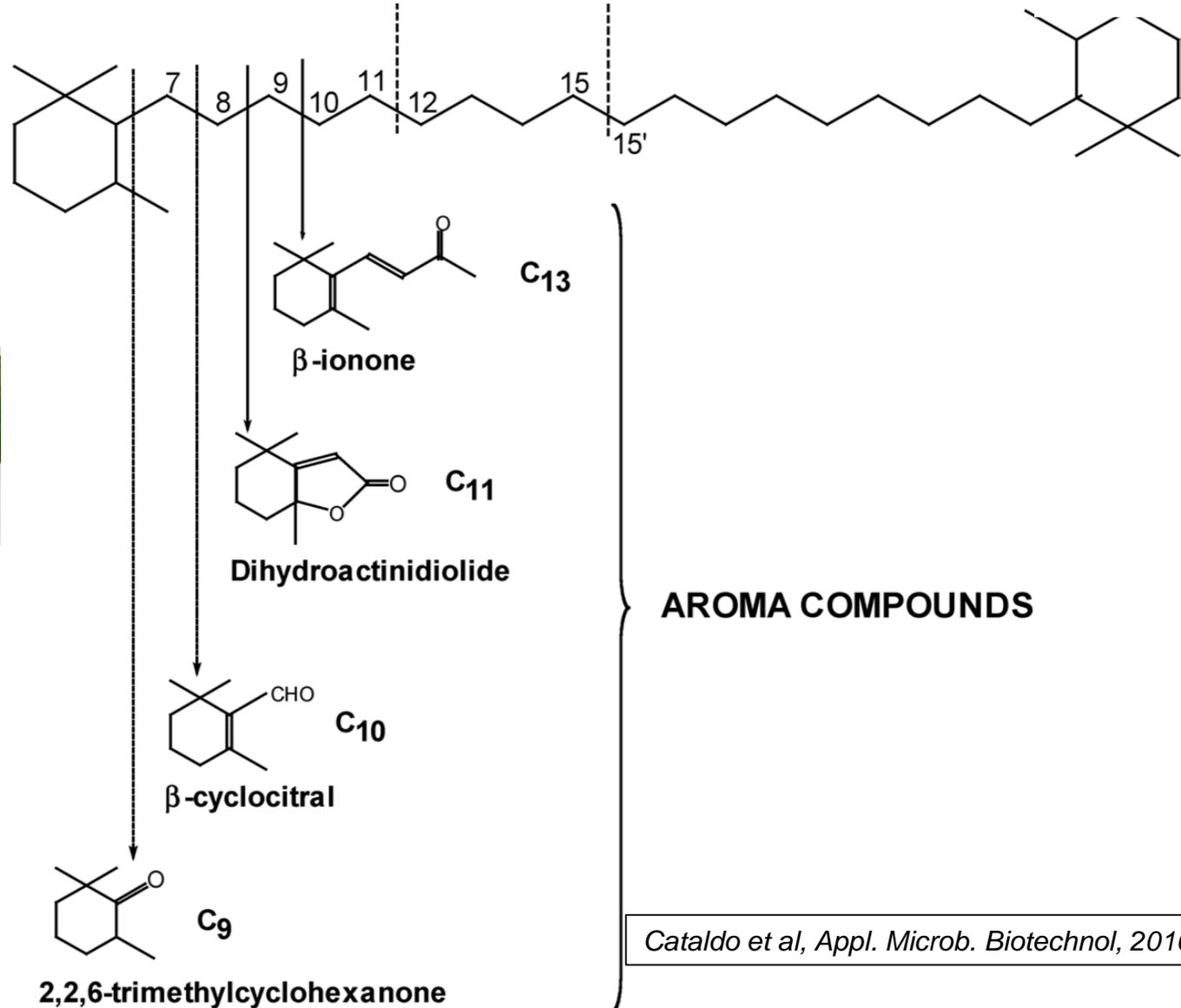
## Background

Hyp./ obj.

Methods

Results

Conclusions





# $\beta$ ionona: un aroma de alto interés en la industria alimentaria y cosmética.

- Presente en flores (violetas, rosas) y frutas (frambuesas).
- Atributos sensoriales: *violeta*, maderoso.
- Umbral de detección: 7 ppt

## Background

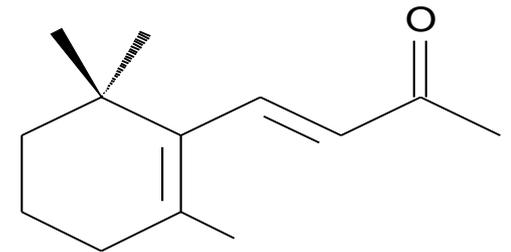
## Hyp./ obj.

## Metodología

## Resultados

## Conclusions

- Uso en cosméticos, detergentes, alimentos y bebidas.
- *Intermediario clave* en la *síntesis de vitaminas A, E and K*.
- Producción anual: 5.000 toneladas (síntesis química).
- Consumidores prefieren el sello “natural”.
- Producción sustentable solo posible mediante organismos recombinantes.





# Ingeniería metabólica de *S. cerevisiae* para sobreproducción de $\beta$ -ionona



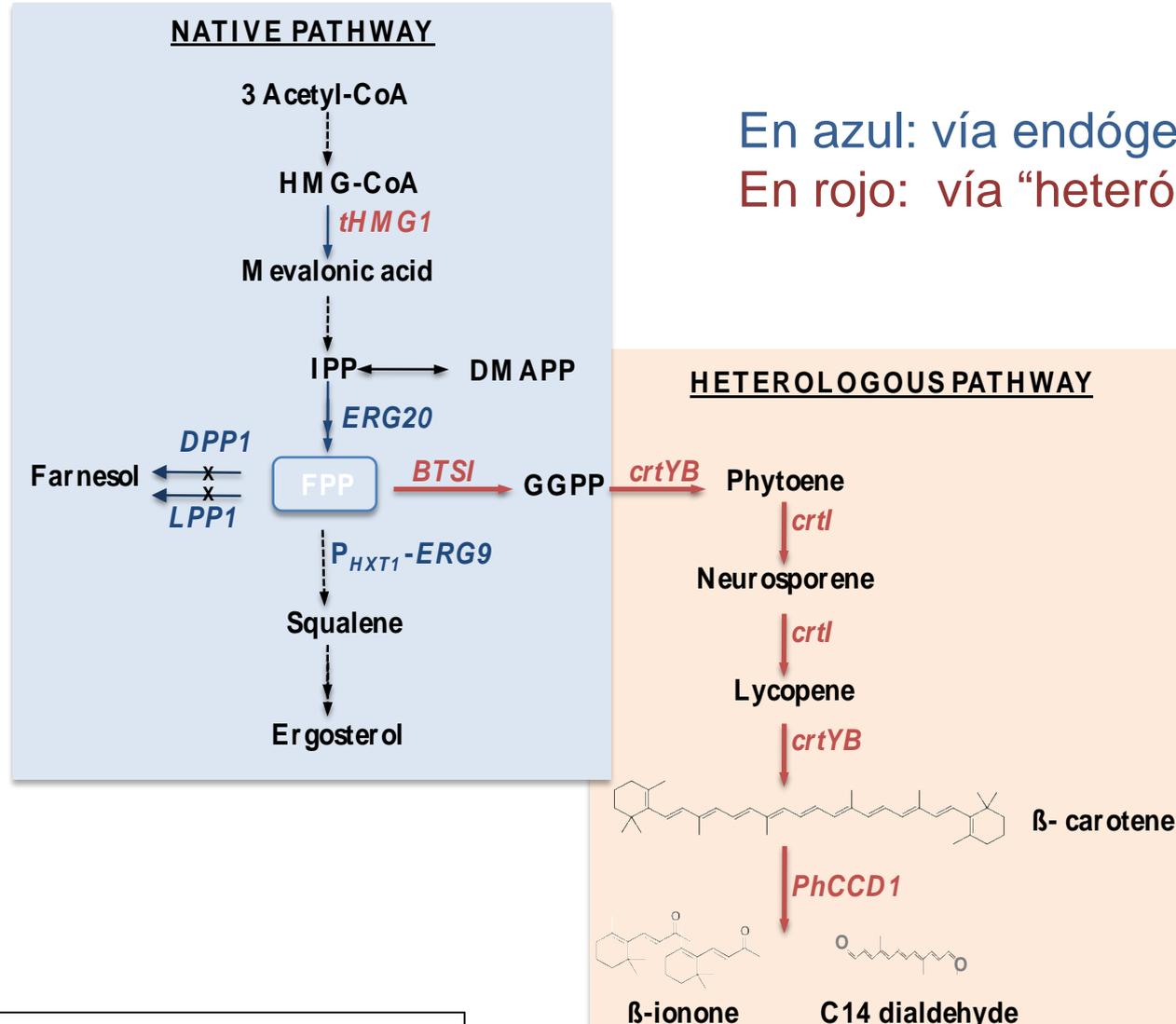
Background

Hyp./ obj.

Metodología

Resultados

Conclusions





# Esquema General de Cepas Construidas



Background

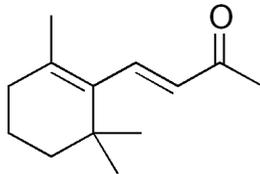
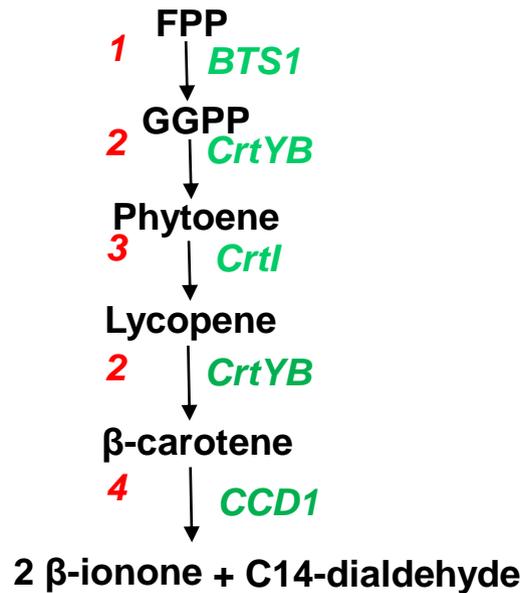
Hyp./ obj.

Metodología

Resultados

Conclusions

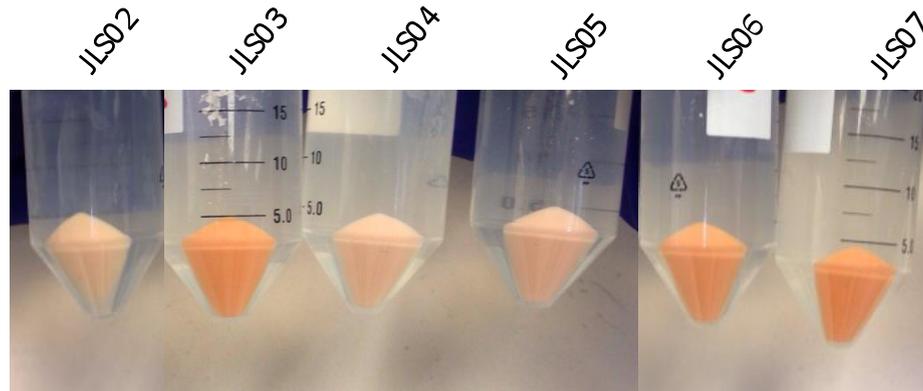
## BIOSYNTHESIS OF $\beta$ -IONONE



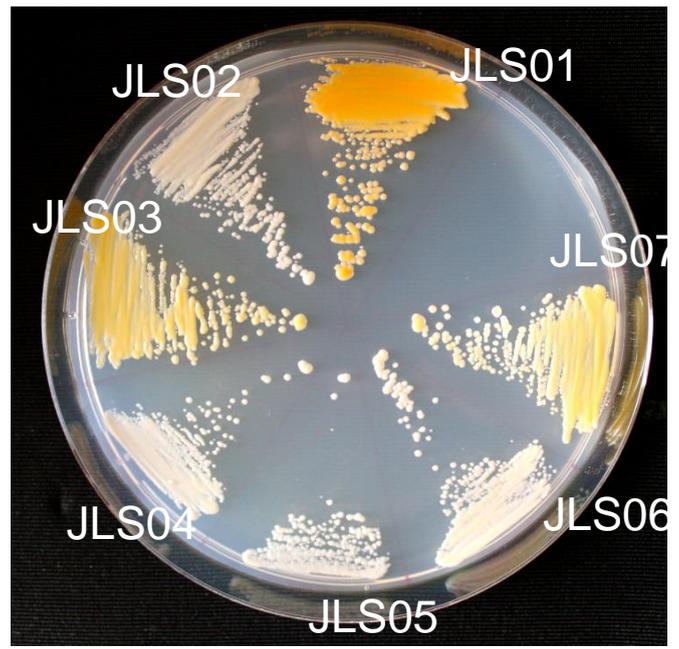
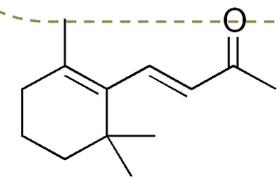
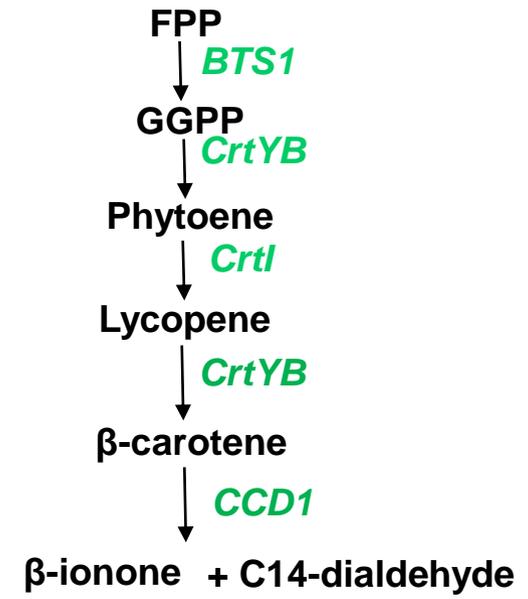
Cepa	Genes integrados	Genes plasmidiales
<i>JLS01</i>	1,2,3	
<i>JLS02</i>	1,2,3,4	
<i>JLS03</i>	1,2,3,4	2
<i>JLS04</i>	1,2,3,4	3
<i>JLS05</i>	1,2,3,4	4
<i>JLS06</i>	1,2,3,4	2,3
<i>JLS07</i>	1,2,3,4	2,4



# Sobrerexpresión de CrtYb, CrtI y CCD1 con vectores de alto número de copias



## BIOSYNTHESIS OF $\beta$ -IONONE



Background  
Hyp./ obj.  
Metodología  
**Resultados**  
Conclusions



# Producción de $\beta$ -ionona luego de 48 horas de cultivo (matraces)



Cepa	Densidad Optica ( 600 nm)	$\beta$ -ionona (ppm)	$\beta$ -ionona (mg/g CDW)	Incremento*
<b>JLS02</b>	3,3 $\pm$ 0,14	0,14 $\pm$ 0,02	<b>0,07 <math>\pm</math> 0,01</b>	<b>1,0</b>
<b>JLS07</b>	3,1 $\pm$ 0,3	1,00 $\pm$ 0,08	<b>0,63 <math>\pm</math> 0,05</b>	<b>9,0</b>

Valores representan Promedio  $\pm$  S.D. de 5 cultivos independientes.

\* Incremento respecto a cepa JLS02.

Background

Hyp./ obj.

Metodología

**Resultados**

Conclusions



# Cinética de crecimiento y síntesis de $\beta$ -ionona en cepa *S. cerevisiae* JLS07 (bioreactor batch 1,5 L)



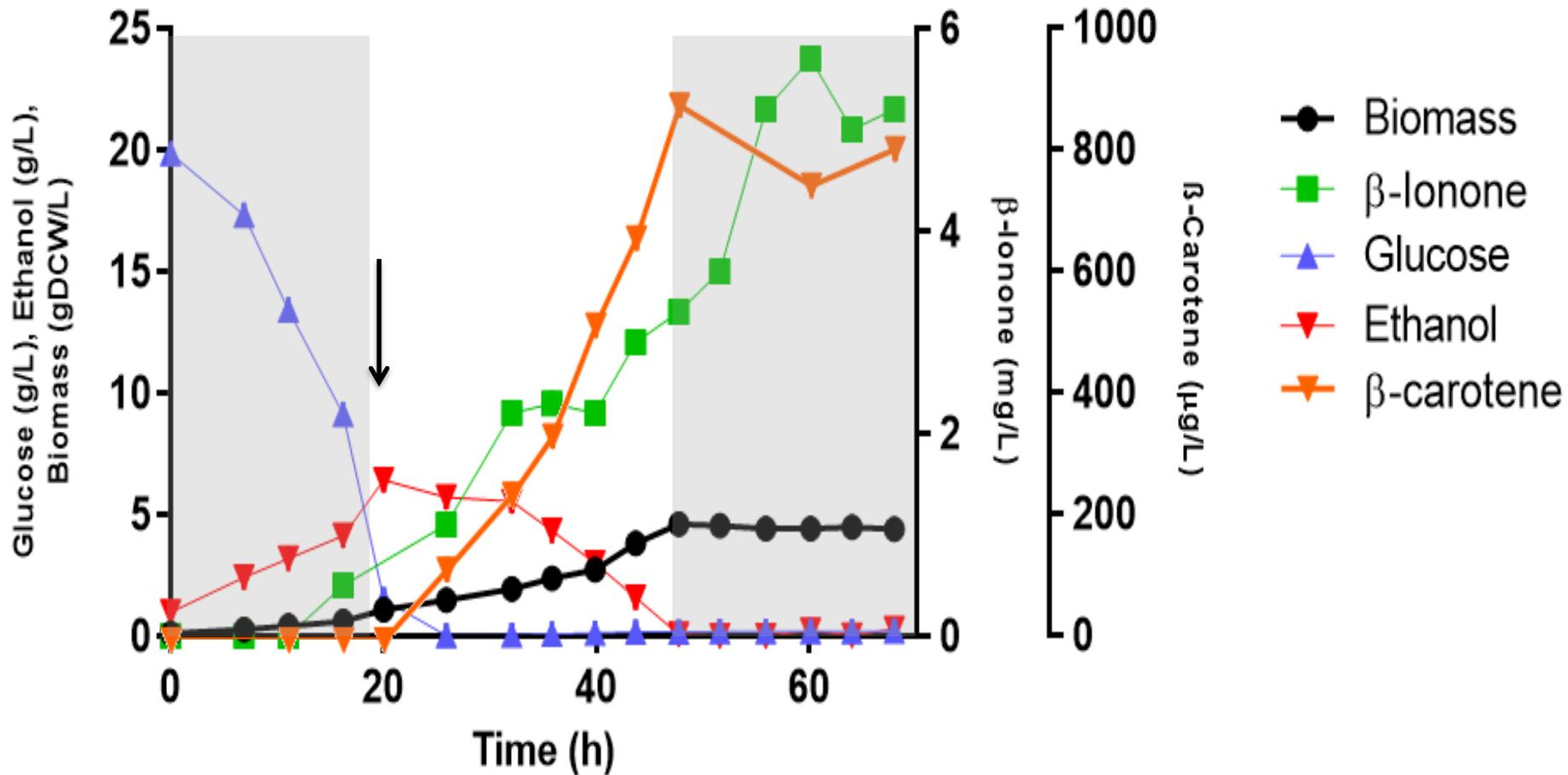
Background

Hyp./ obj.

Metodología

**Resultados**

Conclusions







# Construcción de cepa sobreproductora de $\beta$ -caroteno por evolución adaptativa a $H_2O_2$

1. Transformación con genes carotenogénicos crtE/crtYB/crtI
2. Deleción del gen de la catalasa
3. Evolución adaptativa a  $H_2O_2$

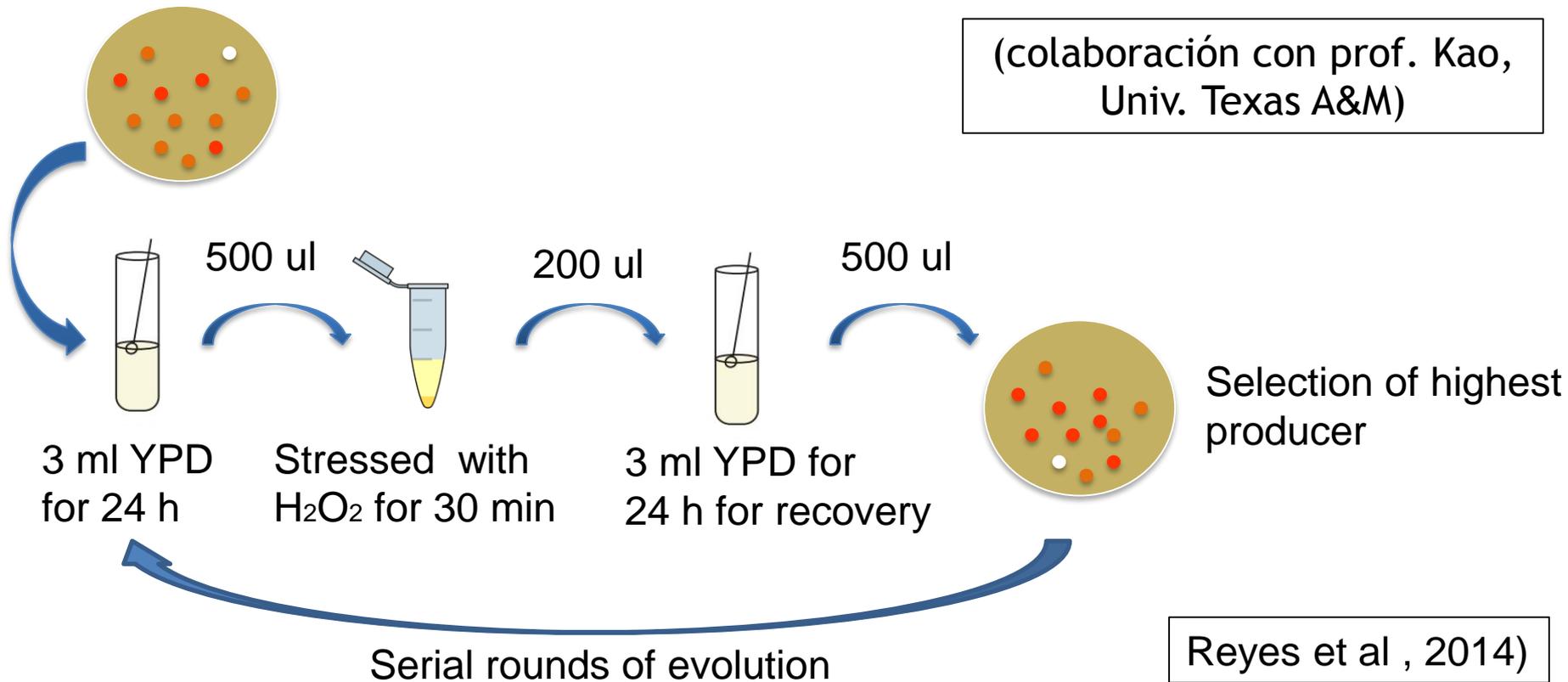
Background

Hyp./ obj.

Methods

Results

Conclusions





La cepa *S. cerevisiae* SM14 acumula ~15 veces más  $\beta$ -caroteno que la cepa JLS01 en matraces



Background

Hyp./ obj.

Metodología

Resultados

Conclusions

Cepa	$\beta$ -Caroteno [mg/g <sub>DCW</sub> ]	Biomasa [g/L]
<b>JLS01</b>	1,5	4,5
<b>SM14</b>	20,0	5,0

*Lopez et al, in preparation*



# Crecimiento y producción de $\beta$ -caroteno de cepa *S. cerevisiae* SM14 cultivada en bioreactor fed-batch de 1,5 L.



Background

Hyp./ obj.

Metodología

**Resultados**

Conclusions



*Lopez et al, in preparation*



# Parámetros del cultivo fed-batch de la cepa SM14 crecida en bioreactor



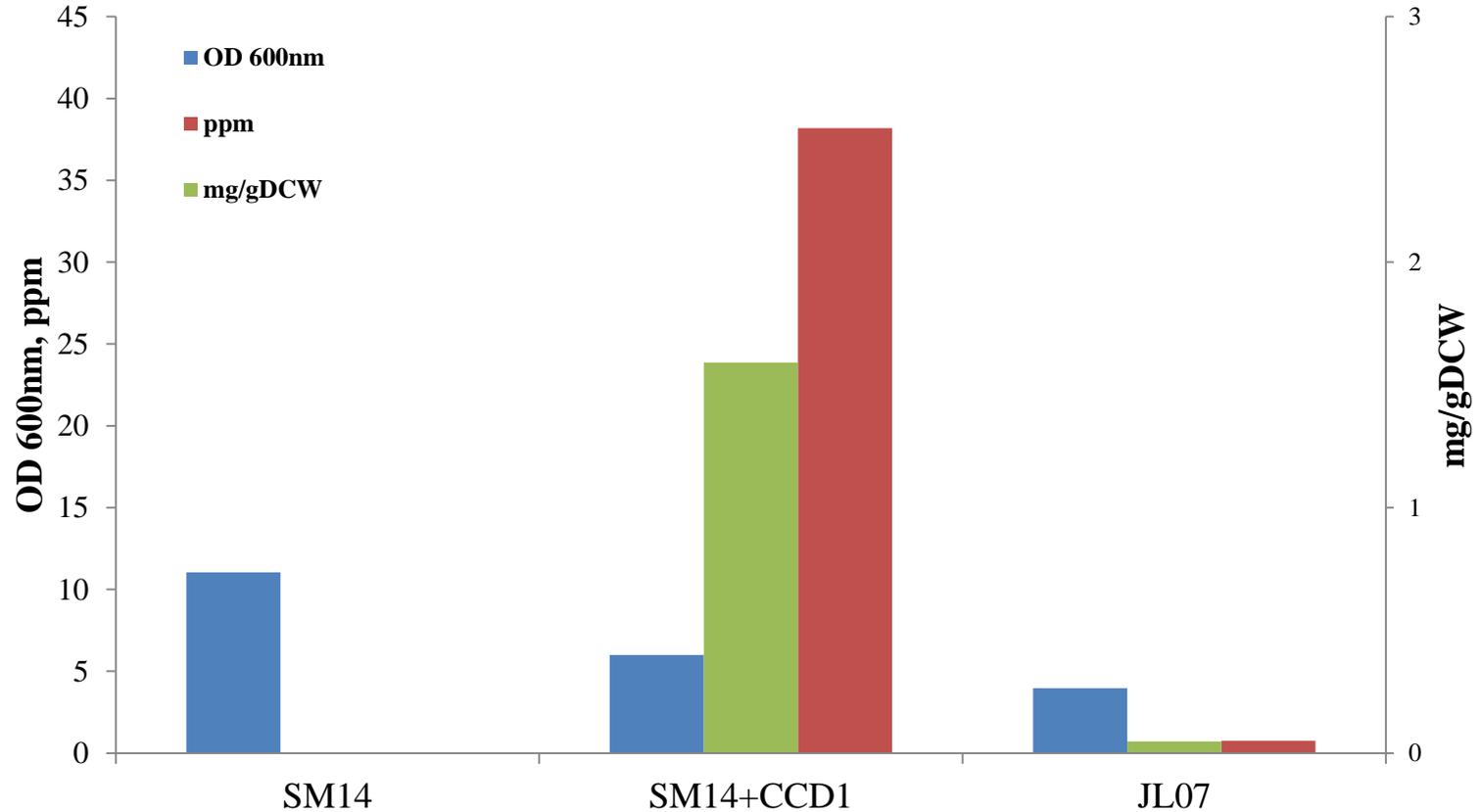
<b>Biomasa Final</b>	<b>95,0</b>	<b>g/L</b>
Productividad de biomasa, $q_x$	305,0	mg/Lh
<b>Concentración final de <math>\beta</math> - caroteno</b>	<b>1,2</b>	<b>g/L</b>
Productividad de Caroteno, $q_p$	3,9	mg/Lh
Rendimiento Caroteno Biomasa	13,0	$mg_C/g_x$
<b>Tiempo fermentación</b>	<b>310,0</b>	<b>h</b>



# La cepa *S. cerevisiae* SM14 produce 50 veces más $\beta$ -ionona que la cepa JLS07 (cultivo en matraces)



Background  
Hyp./ obj.  
Metodología  
**Resultados**  
Conclusiones



Tiempo de cultivo: 48 horas

*Lopez et al, in preparation*



# Conclusiones



- Construimos varias cepas productoras de  $\beta$ -ionona (JLS02-07) combinando la expresión de genes carotenogénicos *crtYB*, *crtl* y el gen de petunia *CCD1*.
- Obtuvimos una concentración de 6 mg/L  $\beta$ -ionona en *S. cerevisiae* JLS07 en bioreactores batch de 1.5 L.
- La integración del gen *CCD1* de petunia en una nueva cepa sobreproductora de  $\beta$ -caroteno (SM14), alcanza 40 mg/L  $\beta$ -ionona, en matraces.
- Cultivos fed-batch en reactores de 1,5L de la cepa SM14 acumulan 1.2 g/L of  $\beta$ -caroteno.
- Cultivos fed-batch en bioreactor de la cepa SM14 transformada con la *CCD1* de *petunia* están en desarrollo.
- El objetivo es lograr [ $\beta$ -ionona] > 1g/L

Background

Hyp./ obj.

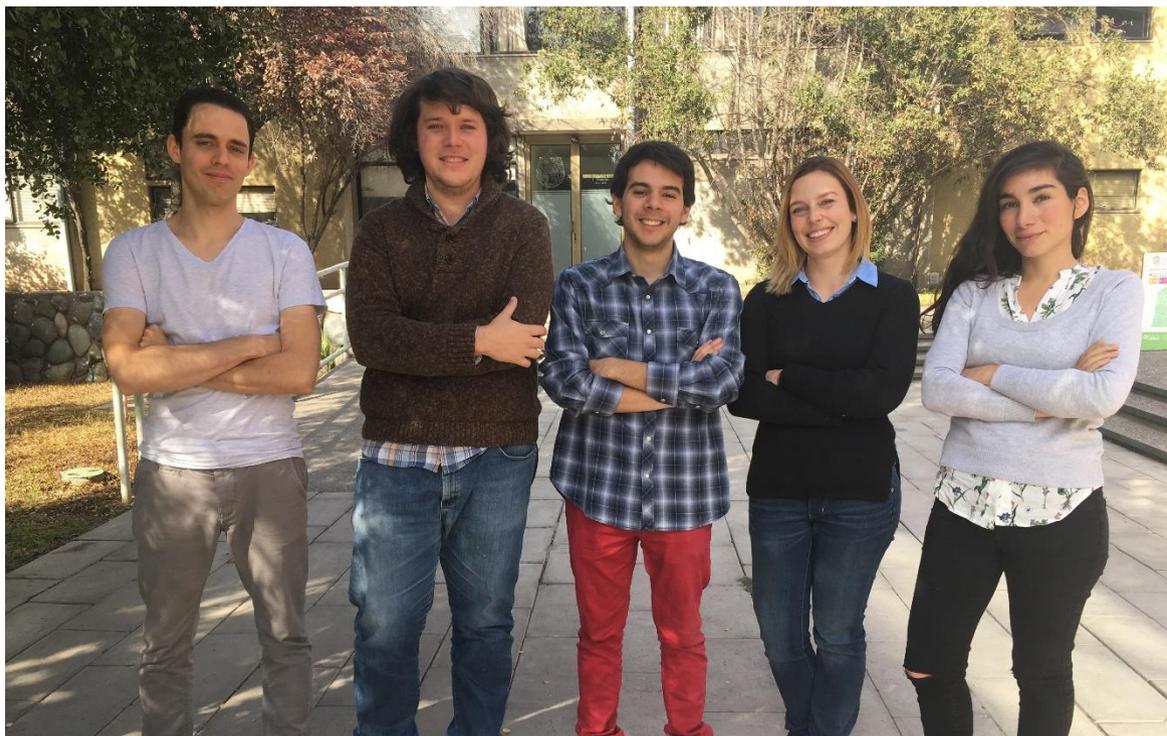
Metodología

Resultados

**Conclusiones**



# Agradecimientos



- Financiamiento:
  - Fondecyt grants N° 1130822 & 1170745
  - Advanced Biotechnology Inc, New York, USA.

\* Prof. Jens Nielsen & Verena Siewers, Chalmers University, Sweden.



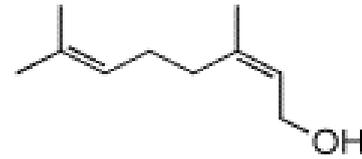
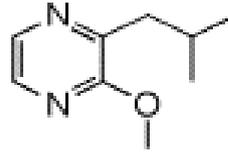
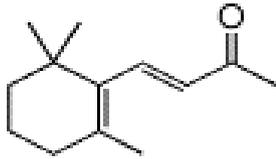
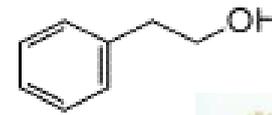
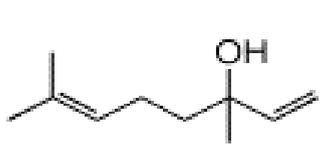
# Producción de Aromas y Sabores por fermentación



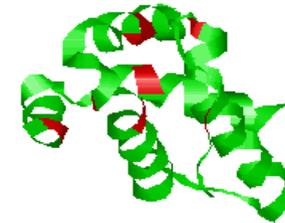
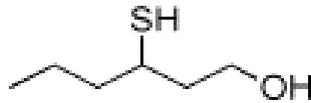
Eduardo Agosin

Centro de Aromas y Sabores, DICTUC

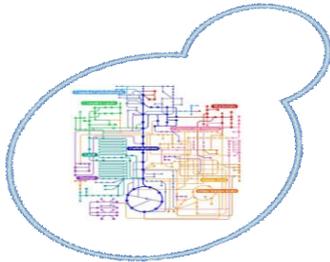
Pontificia Universidad Católica de Chile, CHILE



Aromas



Sweeteners





# Vector construction strategies: USER cloning and Gibson Assembly.

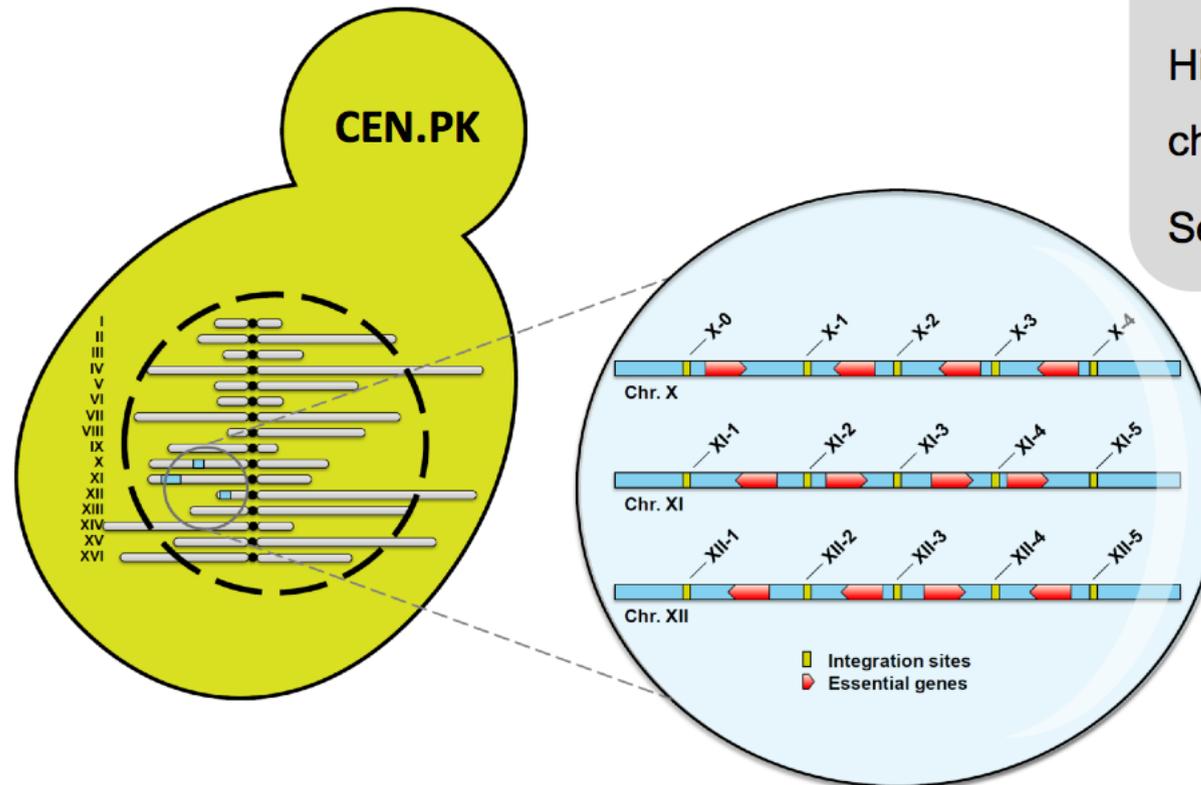
Background

Hyp./ obj.

**Methods**

Results

Conclusions



**15 integration sites selected:**

Highly expressed regions on  
chromosomes X, XI and XII

Separated by essential genes



# Integrative vectors: User Cloning

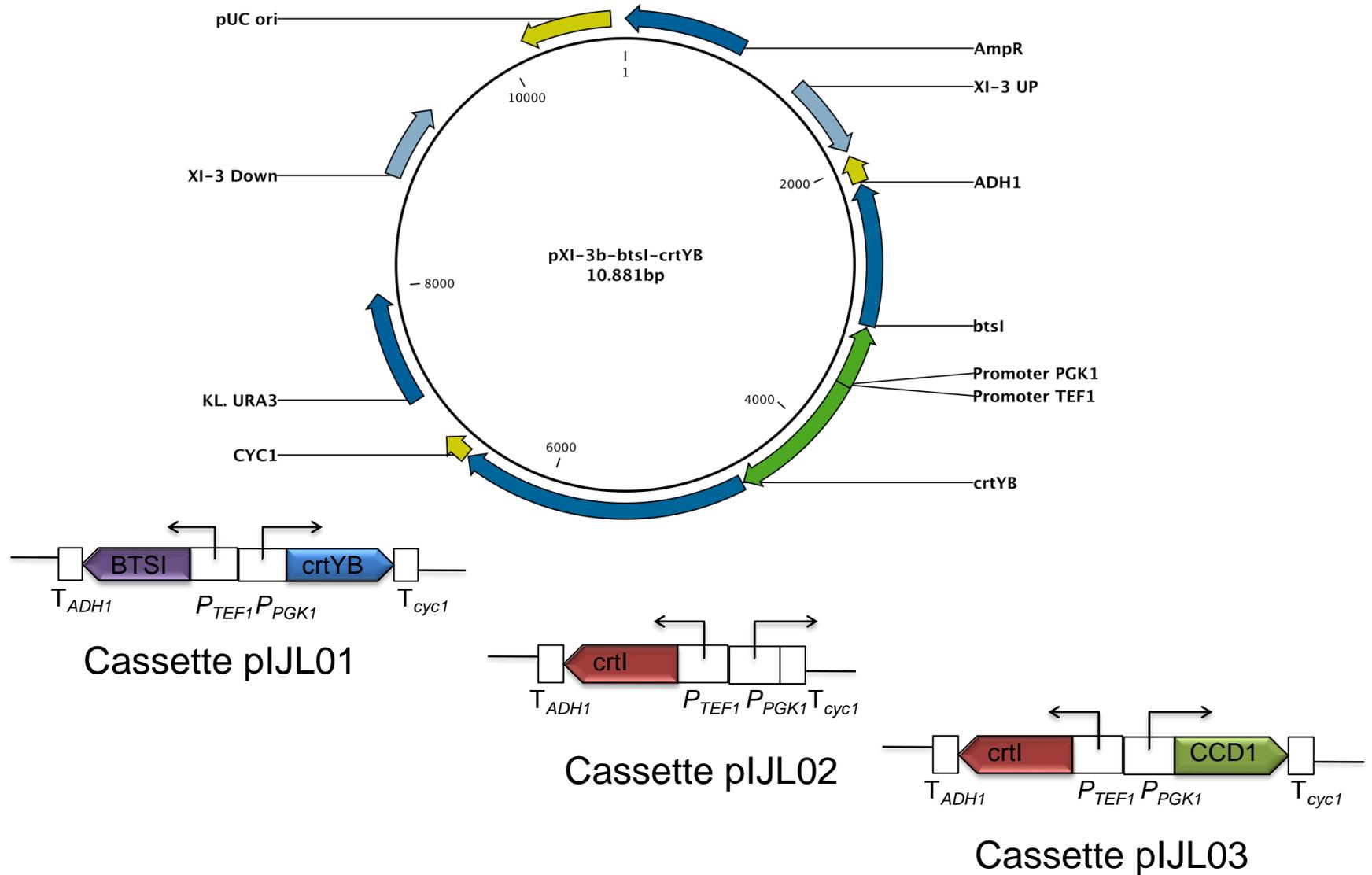
Background

Hyp./ obj.

Methods

Results

Conclusions





# Episomals vectors: Gibson assembly

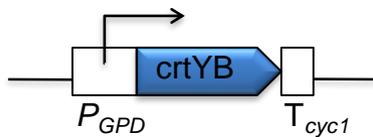
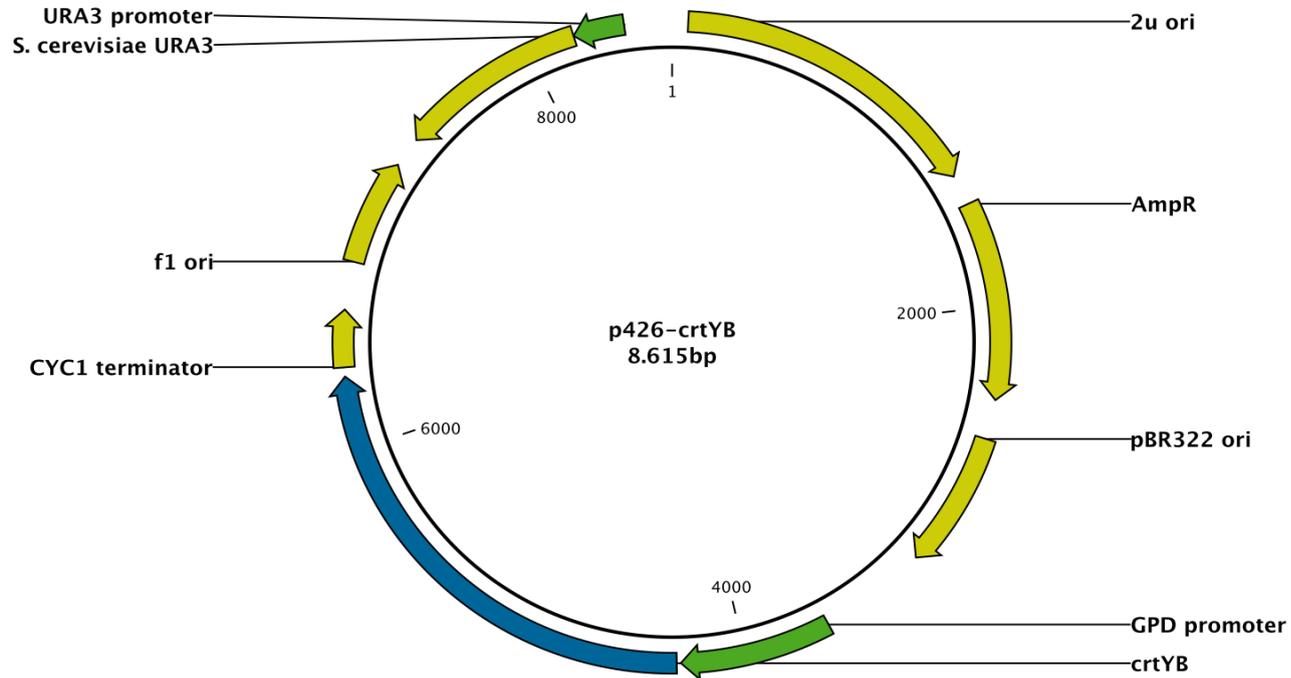
Background

Hip./ obj.

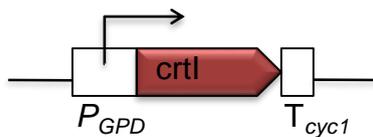
Methods

Results

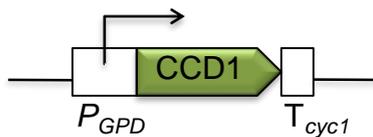
Conclusions



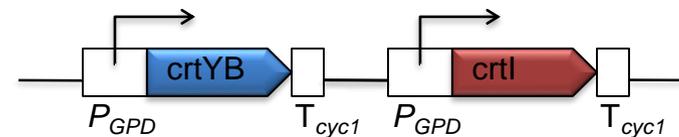
pEJL04



pEJL05



pEJL06



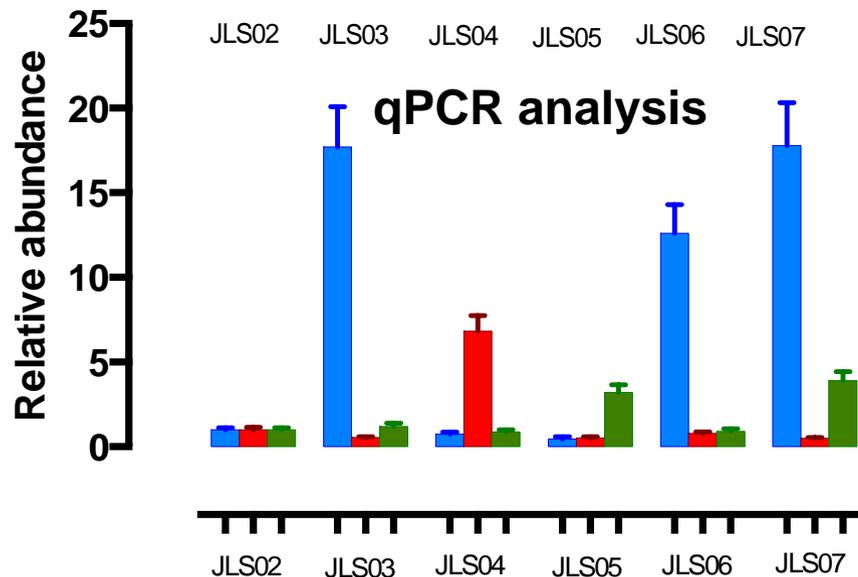
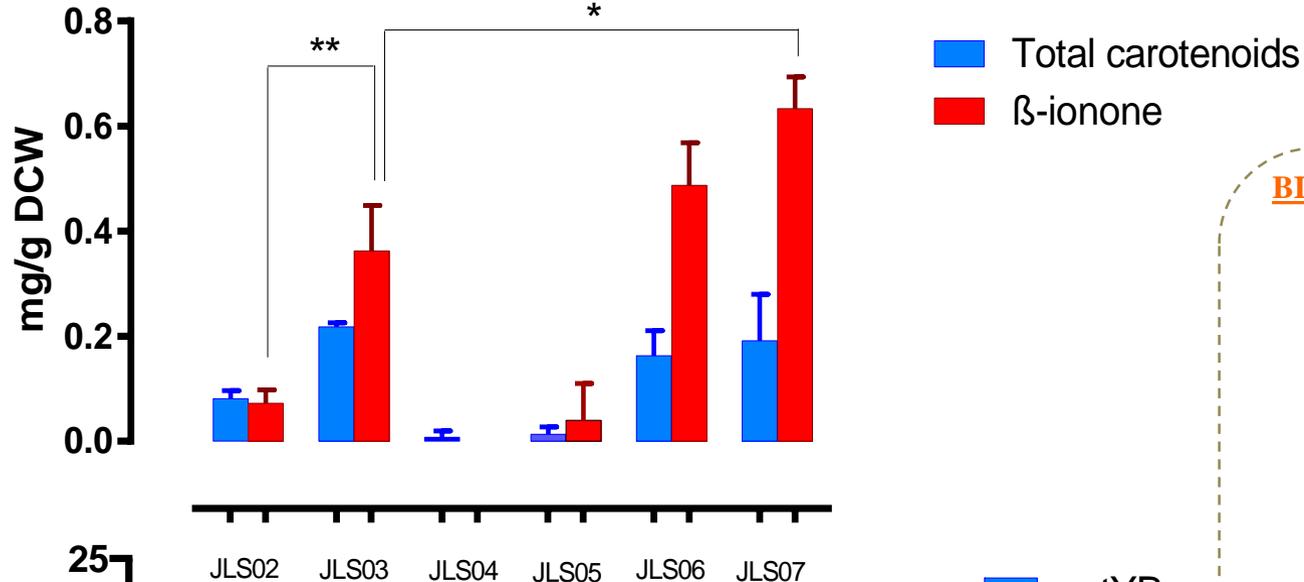
pEJL07



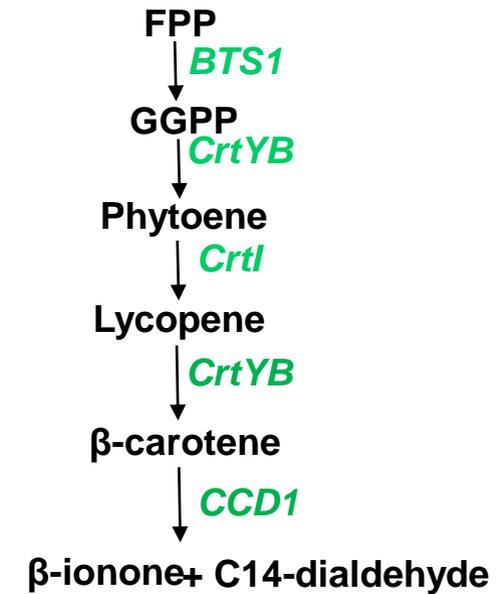
# $\beta$ -ionone and total carotenoids vs. gene expression



## Total carotenoids & $\beta$ ionone



## BIOSYNTHESIS OF $\beta$ -IONONE



Lopez et al, Microbial Cell Factories, 2015

Background  
Hyp./ obj.  
Methods  
Results  
Conclusions