

libragen

biocatalysis, metagenomics
& expertise

Enzymes Innovations Industries

27 & 28 Octobre 2014

Contribution des enzymes à la production d'actifs et additifs cosmétiques

Daniel AURIOL

Directeur Scientifique

libragen – induchem companies

Explore et valorise la diversité chimique associée aux transformations biochimiques

- **Systèmes de transformation**

- > Microorganismes sauvages et enzymes natives
- > Microorganismes modifiés et enzymes améliorées



- **Substances produites par transformation enzymatique**

- > conception, définition, optimisation, développement, industrialisation de bioprocédés

métagénomique

2001

expertise

biocatalyse

2004

Société de recherche sous contrat

Induchem**
companies**

Développe, produit et commercialise
des **ingrédients actifs** et des **systèmes de vectorisation**
pour des **applications cosmétiques**

Enzymes Innovations Industries 27 & 28 Octobre 2014

Actifs

Source: Collection of Information on Enzymes (European Com. 2002)

- Proteases papaine et bromélaïne (effet peeling)
- SOD, catalase et peroxydase (protection de la peau)
- Laccase (coloration des cheveux)
- Lipase (libération *in situ* d'un actif)

> *Limites techniques et sanitaires*



Additifs

[54] ANTI-MICROBIAL COMPOSITIONS

[73] Assignee: **The Boots Company PLC**, Notts, England

[21] Appl. No.: **916,137**

[22] PCT Filed: **Jan. 30, 1991**

[86] PCT No.: **PCT/EP91/00208**

INCI Name	Glucose Oxidase
Functions	STABILISING

Auxiliaires de fabrication

- Biocatalyse appliquée et fermentation

Enzymes cibles

- Peau et microbiote
- Activité et expression
- Tyrosinase, protéases dermiques, toutes fonctions

Biocatalyse appliquée à la production de **substances**, en particulier de substances qui seront **évaluées** en tant qu'**actifs/additifs cosmétiques**

Indu**chem**



libragen

libragen

biocatalysis, metagenomics & expertise

Microorganismes et actifs / additifs cosmétiques

- Microorganismes sauvages
- Microorganismes transformés
 - > **Avantage économique**
(productivité, contrôle et maîtrise)
 - > Diversité chimique dirigée



> Substances fonctionnelles
> Précurseurs de substances fonctionnelles

An Evolution in Product Development?
deal with brings fermentation to the fore.
By Tom Branna, Editorial Director
Published March 24, 2014
(March 2014) A and B will apply A's fermentation technology platform to develop and optimise yeast strains for the sustainable, cost-effective production of this strategically important cosmetics ingredient.

➔ Substituts de produits d'origine animale

- Glucosamine
- Acide Hyaluronique

➔ Substances développées pour d'autres secteurs d'application

- Acides courts (Lactique, Succinique, Gluconique), 1,3-Propanediol, Acides aminés, Tréhalose
- Gomme Xanthane
- Enzymes pour des produits de **biocatalyse**

➔ Substances cosmétiques dédiées **libragen**

- Extraits microbiens plus ou moins raffinés, polysaccharides
- Enzymes pour des produits de **biocatalyse**

libragen

Biocatalyse : une page du répertoire des techniques de synthèse organique

- The **wide repertoire** of classic synthetic methods **has not changed** but it has been **significantly widened** and **enriched** due to the appearance of **biochemical methods**.
- Biochemical methods are **not superior** in a general sense but they definitely represent a **complement** to other methodology in **modern synthetic organic chemistry**.

The production of fine chemicals by biotransformations
Adrie JJ Straathof*, Sven Panke† and Andreas Schmid‡

Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:548–556

" Biocatalysis has matured to a standard technology in the fine chemicals industry "

134 enzyme-based processes reported to be operated on a commercial scale, usually at a scale of > 100 kg/year

K. Faber , University of Graz
Biotransformations in Organic Chemistry
Springer, 2011

The key challenge is not just to do innovative research, but also to develop such research into **cost-effective industrial scale process** that deliver **products of proven utility** to the end customer, and at **prices that gives good returns** on R&D investments to the manufacturer.

Peter S. J. Cheetham, Zylepsis – Adv Biochem Engin/Biotechnol (2004) 56: 83-158

Biocatalyse appliquée : produits et techniques associées

The production of fine chemicals by biotransformations

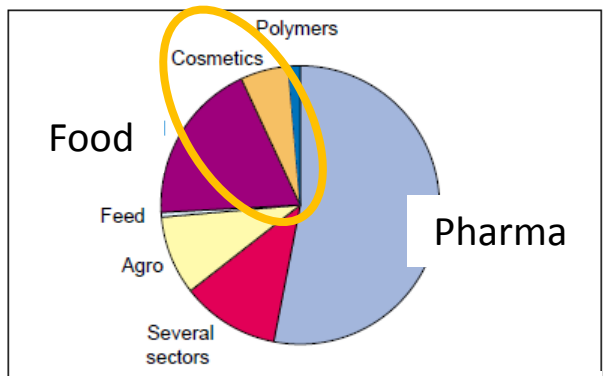
Adrie JJ Straathof*, Sven Panke† and Andreas Schmid‡

Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:548–556

134 industrial biotransformations (2002):

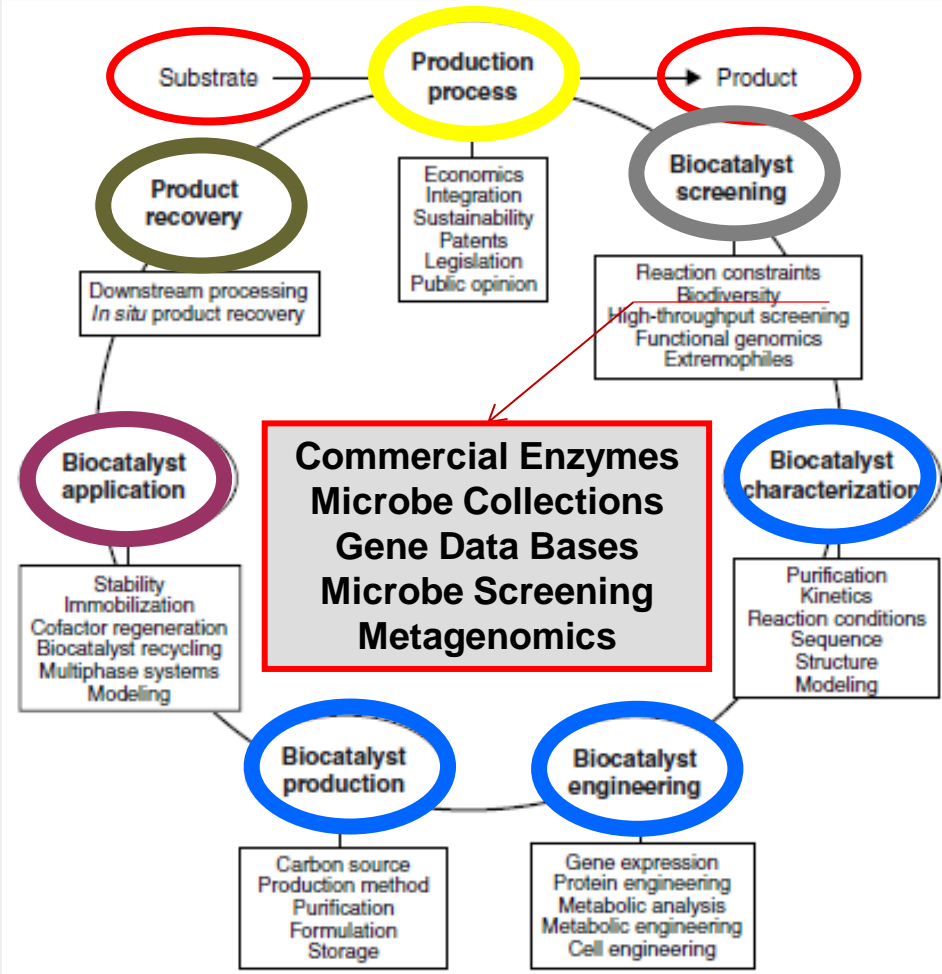
- <5 in 1960, ~ 25 in 1980, ~ 65 in 1990
- **Enzymes:** hydrolases (44%) and redox biocatalysts (30%)
- **Products:** chiral (89%)

Figure 3



Industrial sectors in which the products of 134 industrial biotransformations are used

The biocatalysis cycle



Commercial Enzymes
Microbe Collections
Gene Data Bases
Microbe Screening
Metagenomics

Enzyme technology: an overview
 Jan B van Beilen* and Zhi Li
 Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:338–344

Biocatalyse appliquée : quelques clés

- " **Chemical industry** : successful product developments involve an average yield of 78%, a volumetric productivity of 15.5 g/(L.h) and a final product concentration of 108 g/L "
- " **Pharmaceutical industry** : focus is on time-to-market "

Table 1

Efficiencies of biocatalytic processes for the production of fine chemicals*. Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:548–556

Target compound class	Biocatalysts/enzymes used	Volumetric productivity (g/(L.h))				Final product concentration (g/L)				Yield
		Average	Min	Max	Total number of processes	Average	Min	Max	Total number of processes	% Average
Total		15.5	0.1	130	25	108	0.2	800	64	78 [‡]

Alcools <
Acides <

1/1300

Ac. aminés >
Amides >
Lactames

Alcools <
Acides <
Lactames

1/4000

Alcools > Amides
> Sucres et
Acides Aminés

Biocatalyse et actifs/additifs cosmétiques

Exemples de produits/procédés enzymatiques (d'après COSM'ING, 1998 – 2013)

1998	SILAB (peptides à partir de plantes) – HENKEL (hydrolysats protéiques) – CODIF, SCIENCE ET MER (oligosaccharides/alginate et carraghénanes)
2001	BIOEUROPE-SOLABIA (Acides aminés substitués et peptides; AURIOL <i>et al</i> , EP0313446, 1987: N-L-Malyl-L-Tyrosine et FR 2740453, 1995: oligomères de L-Lysine)
2004	SOLABIA (pseudo-céramides)
2007	SOLABIA (dérivés d'acides gras Ω -3) – FIRMENICH (parfumerie)
2010	PROTEUS (parfumerie) – LIBRAGEN (glucosides) – SOLIANCE (tensio-actifs)
2013	SOLABIA (polyphénols condensés)

Autres

BIOEUROPE-SOLABIA (glucooligosaccharides: BioEcolia[®], EP0591443, 1994)

HAYASHIBARA (glucoside d'héspéridine -1989-, de rutine -1989-, de vitamine C-1990)

EZAKI GLICO (alpha-arbutine, 2002)

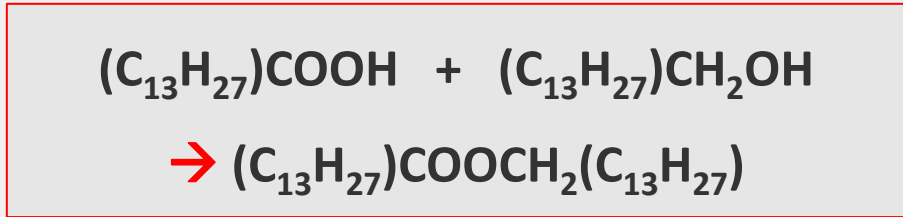
Biocatalyse, ingrédients cosmétiques et chimie verte

O. Thum*, K. M. Oxenbøll**

Biocatalysis – A Sustainable Method for the Production of Emollient Esters

SÖFW-Journal | 134 | 1/2-2008

Keywords: biocatalysis, emollient esters, »white biotechnology«



		Conventional	Enzymatic
Electricity	(primary energy, GJ)	0.63	2.38
Heating energy	(from electricity, GJ)	6.34	0.76
Gaseous nitrogen	(liters)	3200	
Tin(II) oxalate	(kg)	25	
Enzyme	(kg)		0.27
Filter aid	(Tonsil, kg)	25	
Bleach: NaOCl2	(kg)	20	
water for steam	(kg)	105	
cooling water	(kg)	570	
Waste water	(kg)	445	180
Tin-containing waste	(kg)	70	
Enzyme waste	(kg)		0.5

Table 1 Inventory table for the production of myristyl myristate on 5 ton scale

Analyse du Cycle de Vie		Conventional	Enzymatic
Total energy from electricity	(GJ)	6.97	3.14
liquid nitrogen	(kg)	5	
Tin from mining	(kg)	14	
Sodium formiate	(kg)	17	
H2SO4, 96%	(kg)	18.2	
Ca(OH)2, solid	(kg)	9.3	
Enzyme	(kg)		0.27
NaOCl, 15%	(kg)	133	

Table 2 Final inventory table for the LCA

Impacts		Conventional	Enzymatic	Savings
Energy	GJ	22.5	8.63	62%
Global warming	kg CO2 eq.	1518	582	62%
Acidification	kg SO2 eq.	10.58	1.31	88%
Nutrient enrichment	kg PO4 eq.	0.86	0.24	74%
Smog formation	kg C2H2 eq.	0.49	0.12	76%

Table 3 Impact on the defined five environmental key parameters

Identification d'une cible / soin et beauté de la peau

- **Glycosides naturels**

- De nombreux **produits naturels bioactifs** (polycétides, flavonoïdes, glycopeptides) contiennent un **motif sucré** (mono, di ou oligosaccharides).
- Les glycosides jouent des **rôles** divers : des molécules **structurales** et des réserves d'**énergie** jusqu'aux **étiquettes de reconnaissance** qui permettent aux cellules et aux molécules d'interagir les unes avec les autres.
- Les **propriétés** physiques, chimiques et biologiques des petites molécules sont **modulées** par la **glycosylation**. Cette modulation des propriétés s'applique aussi bien aux **entités naturelles** produites par des organismes vivants qu'aux **entités non naturelles** qui sont conçues et synthétisées chimiquement.

- **Glycosylation : production de propriétés**

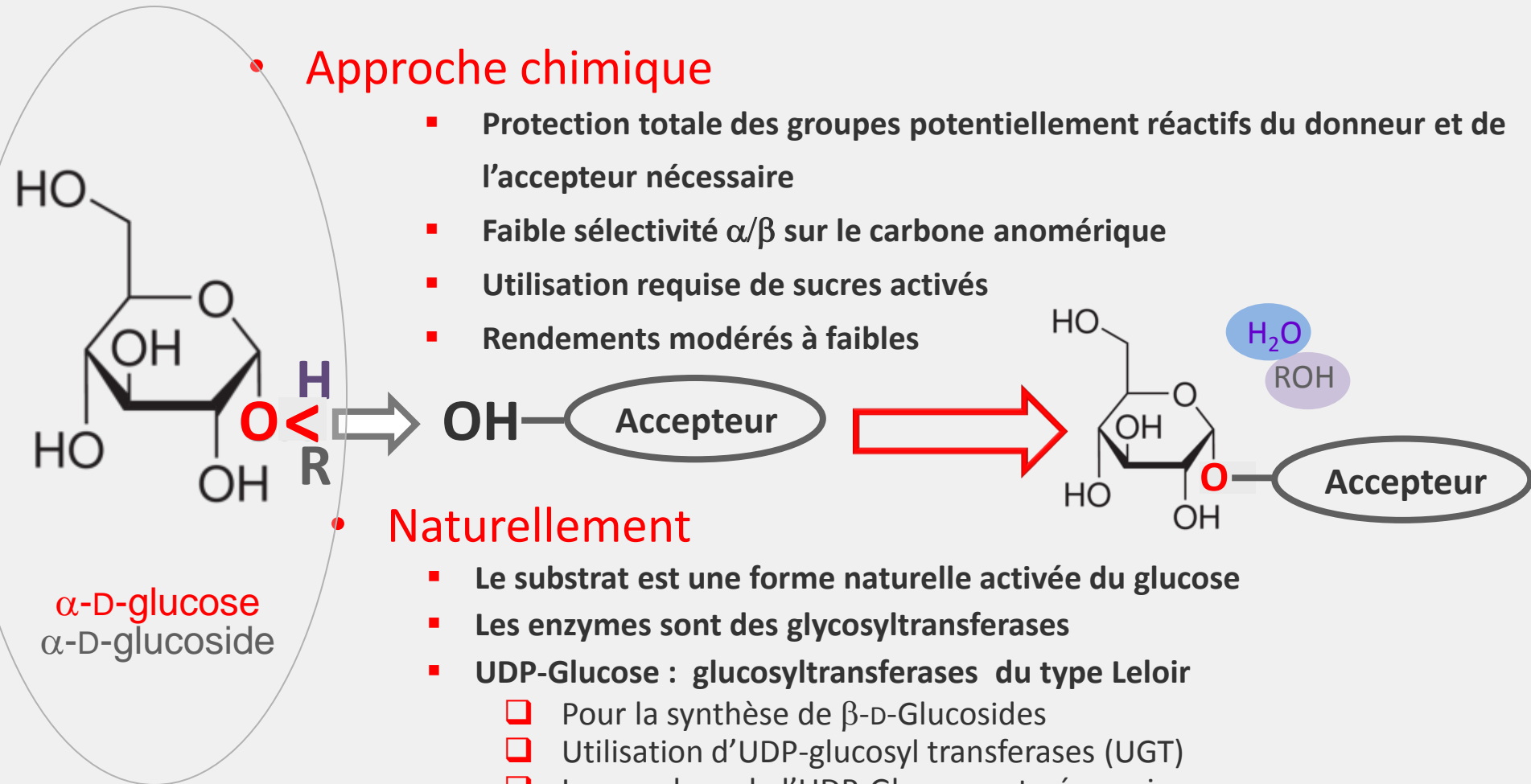
The most fundamental and lasting objective of synthesis is not production of new compounds, but production of properties.

George S. Hammond, Norris Award Lecture, 1968

Glucosylation

• Approche chimique

- Protection totale des groupes potentiellement réactifs du donneur et de l'accepteur nécessaire
- Faible sélectivité α/β sur le carbone anomérique
- Utilisation requise de sucres activés
- Rendements modérés à faibles



• Naturellement

- Le substrat est une forme naturelle activée du glucose
- Les enzymes sont des glycosyltransferases
- UDP-Glucose : glycosyltransferases du type Leloir
 - Pour la synthèse de β -D-Glucosides
 - Utilisation d'UDP-glucosyl transferases (UGT)
 - Le recyclage de l'UDP-Glucose est nécessaire
- Saccharose : Saccharose : [accepteur] X- α -D-glycosyltransferases
 - Glycosyltransferases pour la synthèse d' α -D-glucosides
 - Phosphorylases pour la synthèse d' α -D-glucosides

Glucosylation : approches comparées / chimie verte

α/β -alkyl-glucoside synthesis via chemical routes

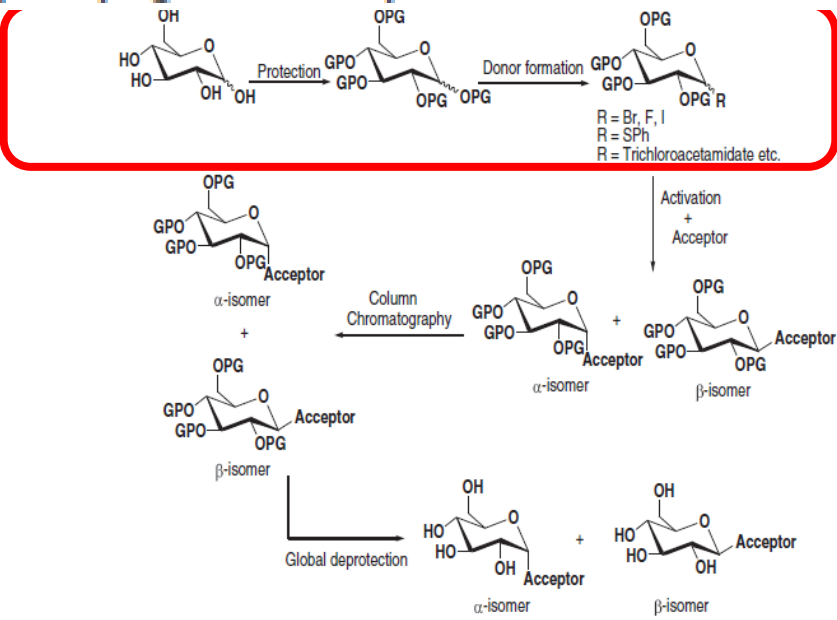


Figure 1 General strategy of glycosylation for α/β -alkyl-glucoside synthesis via chemical routes. Global protection (GP) of all hydroxyl groups using acetic anhydride/sodium acetate, aldehydes, acetals or benzoyl halides at 140°C. Activation step involves exchange of anomeric group by bromine (Br), fluorine (F), iodine (I), Thiophenol (SPh) or trichloroacetamide. Deprotection of final product by sodium methoxide in methanol.

Rather and Mishra *Sustainable Chemical Processes* 2013, 1:7
<http://www.sustainablechemicalprocesses.com/content/1/1/7>



REVIEW **Open Access**

β -Glycosidases: An alternative enzyme based method for synthesis of alkyl-glucosides

Mohd Younis Rather¹ and Saroj Mishra^{2*}

Glycosidase

Transferase

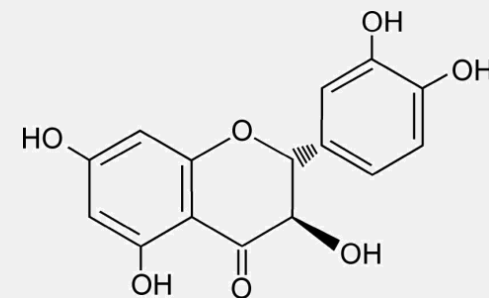
Glycosidase

Table 1 Comparison of enzymatic and chemical glycosylation in terms of Space-Time Yield and E-factor

Glycosylation method	Glycosyl donor	Product	E factor (kg waste per kg product)	Space-time yield (g/l/d)	Reference
Direct glycosylation (by glycosidase)	Glucose	Glc β -O(CH ₂) ₆ OH	0.5	5.6	[48]
Transglycosylation (by β -galactosidase)	Lactose	Gal β -O(CH ₂) ₆ OH	3	2380	[49]
Koenigs-Knorr method	Galactose	Gal β -OPh-2-NO ₂	10	26	[50]
Direct glycosylation (by glycosidase)	Glucose	Glc β -OCH(CH ₃)CHCH ₂	2	10	[51]
Koenigs-Knorr method	Glucose	Glc β -OCH(CH ₃)CHCH ₂	20	36	[52]

Taxifoline

(+)-3,3',4',5,7-pentahydroxyflavanone



- **Cible : polyphenols**

- Antioxydants et propriétés spécifiques (santé, nutrition, cosmétiques)
- Très faible solubilité dans l'eau (pH de 5 à 6.5) et très fortement sensibles à l'oxydation : formulation délicate

- **Modulation des propriétés physico-bio-chimiques par glycosylation**



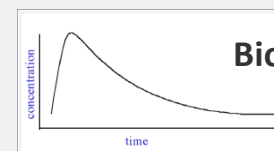
Solubilité dans l'eau



Stabilité chimique (oxydation)

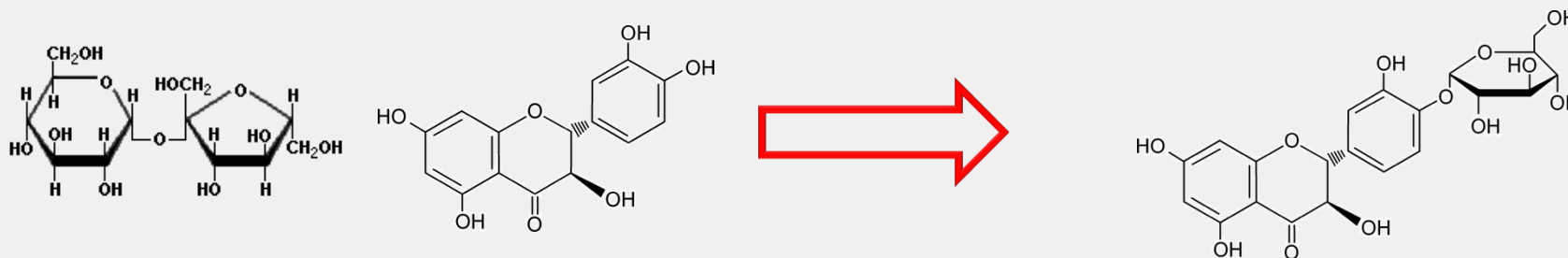


Spécificité d'action



Biodisponibilité

- **Glycosylation à l'aide de saccharose comme donneur de glucose**



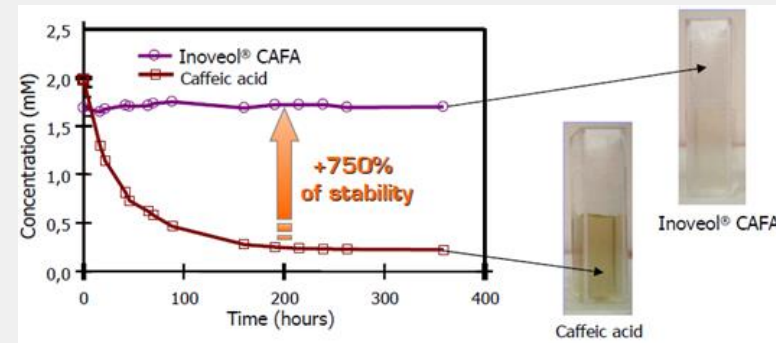
Exploitation d'une faille dans la sélectivité de l'enzyme (promiscuité catalytique)

Procédé global de glucosylation

- Fermentation (souche GRAS)
- Isolement de l'enzyme
- Enzyme libre: 30°C, pH 5.2, 24 – 36 heures
- 5 – 25 g/L/j
- Elimination
 - * sucres résiduels et enzyme
 - * aglycone
- Rdt: 80%
- Pureté: > 96%
- 100 kg
- Indu**ch**em

Modulation des propriétés physico-chimiques par glucosylation

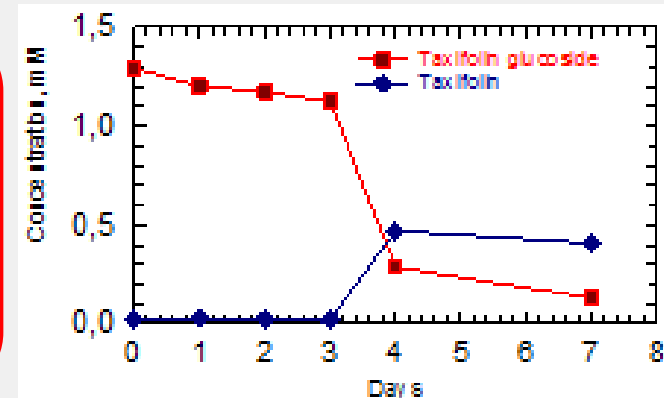
- Solubilité dans l'eau, pH 5.2: > 100 g/L
- Glucoside de l'acide caféique : stable à pH 7.1, 45°C
- La Taxifoline est libérée enzymatiquement du Glucoside de Taxifoline



Glucosyl-Polyphenols

- EP 2027279
- EP 2379576

Indu**ch**em



En conclusion

- **Ce qui est dit sur les enzymes et la situation aujourd'hui**

Biocatalysis. Andreas S. Bommarius and Bettina R. Riebel
Copyright © 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
ISBN: 3-527-30344-8

- " Enzymes only feature limited substrate specificity "



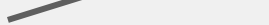
Le plus souvent un avantage; des substrats non canoniques doivent être évalués; reconsidérer les conditions de mise en œuvre des enzymes, la séquence de synthèse; l'évolution des enzymes peut être avantageuse

- " there is only limited availability of enzymes "

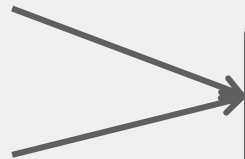


Ceci n'est plus vrai avec les techniques actuelles de l'ADNr, les progrès en fermentation et les offres des CROs et CMOs

- " only a limited number of enzymes exist "



- " protein catalyst stability is limited "



Immobilisation, évolution des enzymes et diminution du coût de production des enzymes

- " enzyme reactions are saddled with limited space-time yield "



- " enzymes require complicated co-substrates such as cofactors "



De plus en plus de méthodes de génération *in situ*

- la **biocatalyse et ses techniques associées** sont mises en œuvre par diverses sociétés (françaises) pour produire des **actifs et additifs** qui répondent à des **demandes** pour la beauté et le soin de la peau (secteur de la cosmétique)
- **libragen** a conçu et développé des procédés basés sur la biocatalyse pour **produire** une série de **polyphénols glucosylés** (taxifoline, acide caféique, acide rosmarinique, EGCG, oleuropéine, phlorétine, acide gallique et resvératrol) et une série de **sucre phosphorylés** (NAcGlcNH₂ – 6P, alkylglucosides – 6P)

Successful application of biocatalyst for organic transformations in industries depends on factors that include **availability** of **suitable enzyme**, **ease** of **up-** and **downstream processing**, **competition** with established **chemical** methods, **time** required for **process development**, biocatalyst disposal, possible perception of technologists and engineers, and **government regulations**. Peter S. J. Cheetham, Zylepsis

Merci pour votre attention