



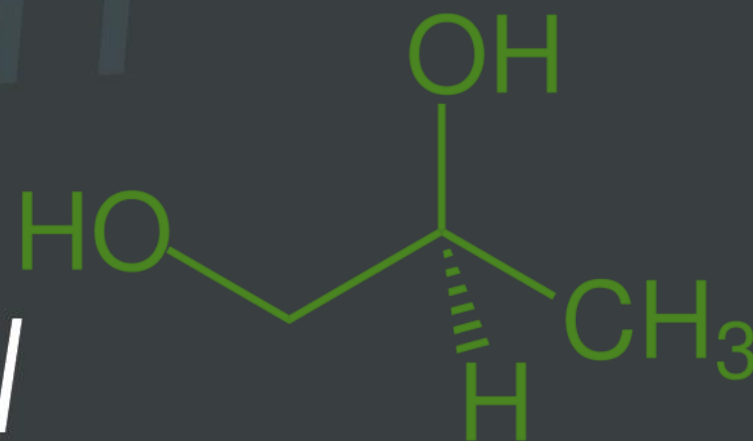
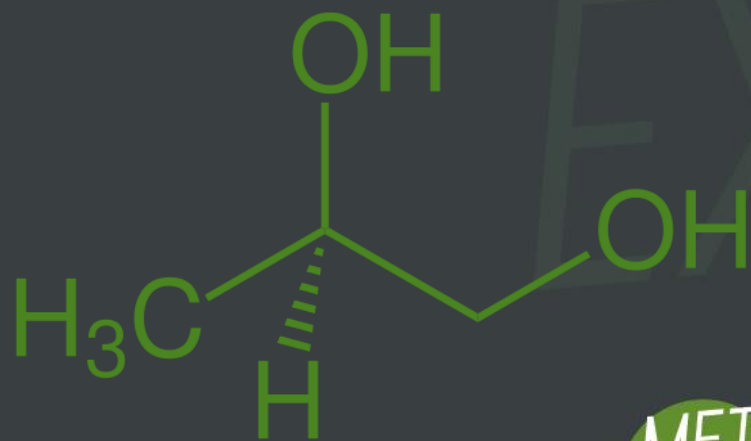
Thomas DESFOUGERES
Responsable R&D METabolic EXplorer

Les mardis de la chimie durable

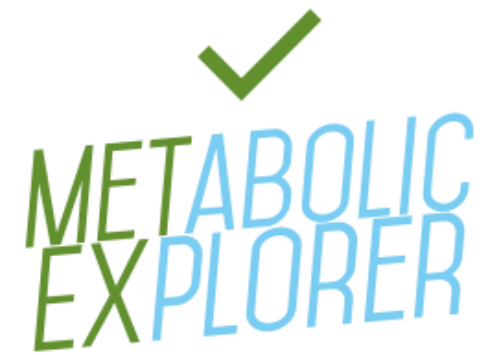
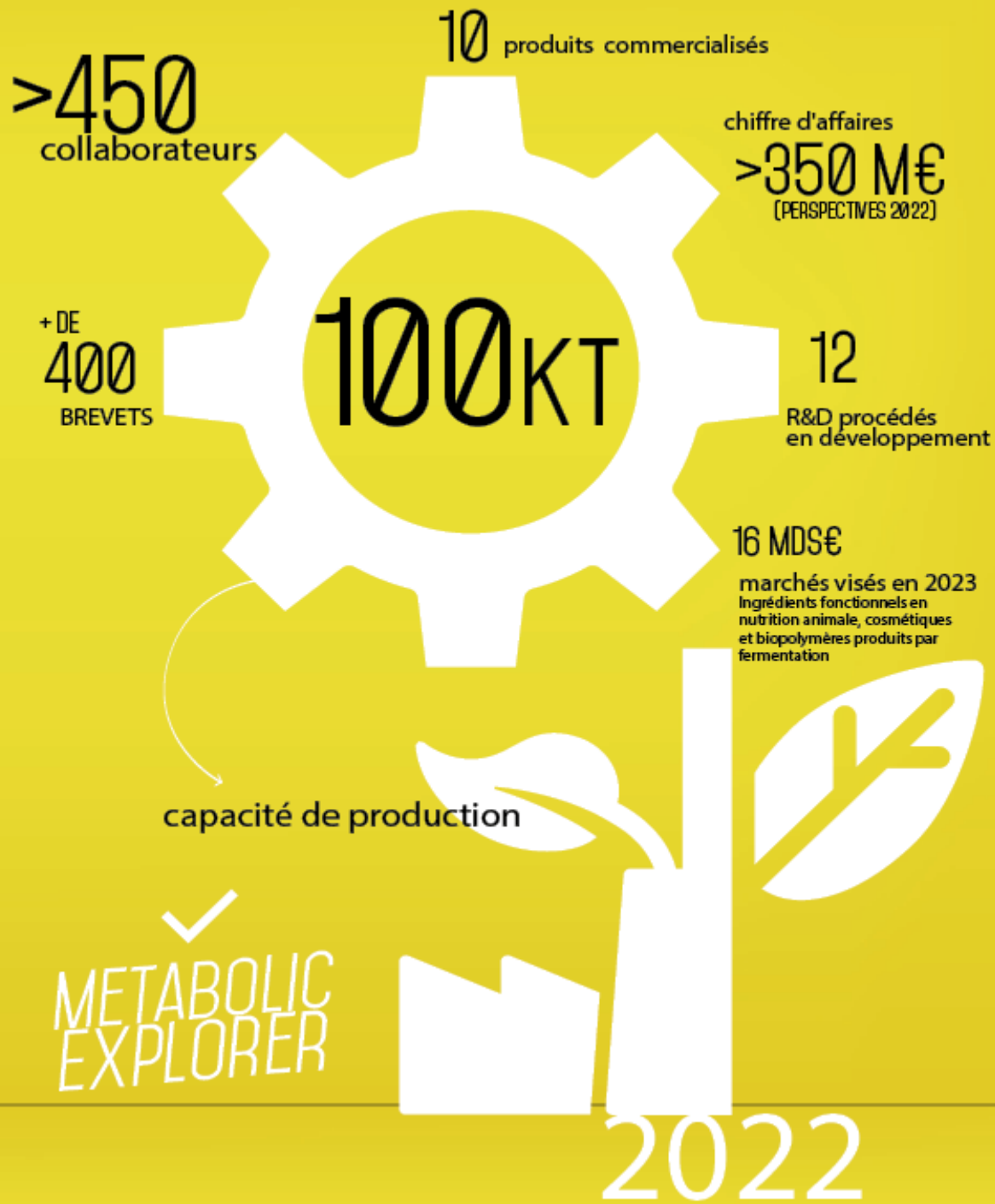
Le 8 mars 2022



Bio production de 1,2 propanediol Monopropylène Glycol (MPG)



INDUSTRIAL BIOCHEMISTRY **ALTERNATIVE NOW**



Leader européen pour la production et la commercialisation d'ingrédients fonctionnels fabriqués par fermentation



Marchés visés :
Nutrition Animale, Cosmétique et Biopolymères

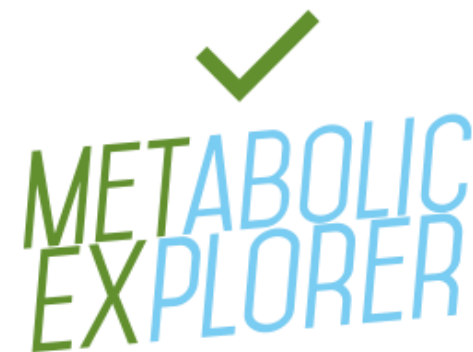


ALTERNATIVE NØV

INDUSTRIE+ÉCOLOGIE



WELCOME TO A NØØV WORLD



Notre raison d'être:

CONTRIBUER À
LA NÉCESSAIRE TRANSITION ÉCOLOGIQUE
EN INNOVANT
POUR PRODUIRE AUTREMENT,
PAR FERMENTATION,
DES INGRÉDIENTS FONCTIONNELS
QUI ENTRENT DANS LA FABRICATION
DES PRODUITS DE GRANDE CONSOMMATION.





Contexte du 1,2 propanediol ou Monopropylène Glycol

Les multiples applications du 1,2 propanediol



Plasturgie



Additif alimentaire E1520 utilisée comme solvant d'arome.



Cigarette électronique



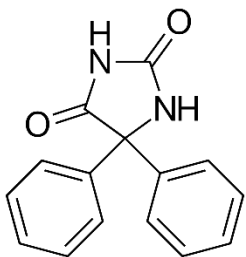
Détergent



Alimentation animale en réduisant l'acétonémie en début de lactation



Fluide caloporteur avec des propriétés non corrosives



Pour 40 % du médicament Dilantin®



Machine à fumée lourde

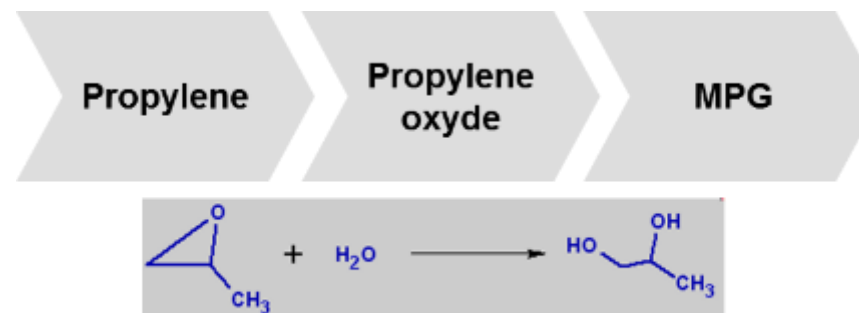


Aéronautique pour le dégivrage des avions

Les sources usuelles de MPG

Propylene oxide hydratation process

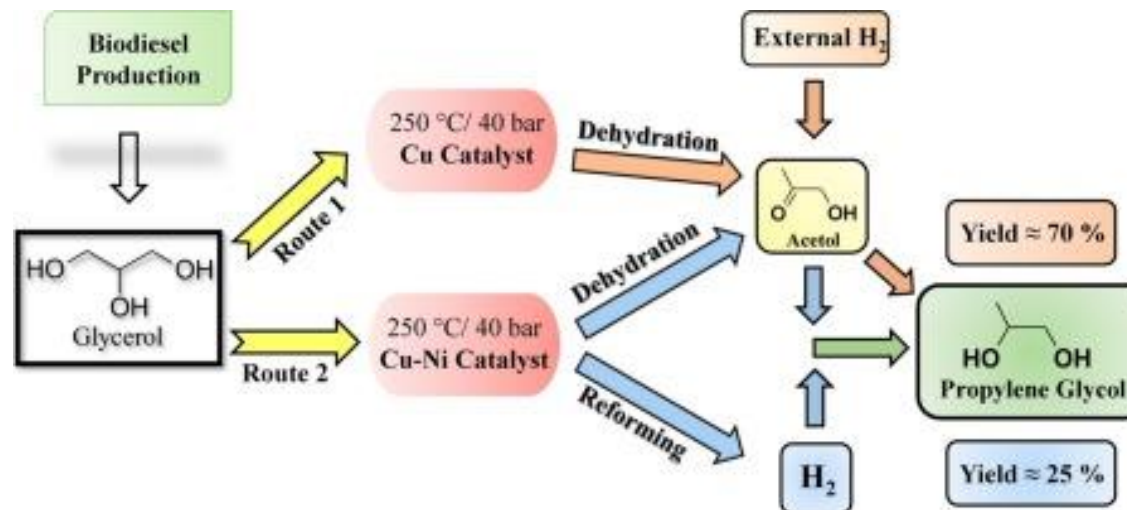
- 55-60% Propylène oxyde utilisé pour les polyuréthanes
- production de sous-produits
- Mélange (R)-1,2-propanediol/(S)-1,2-propanediol



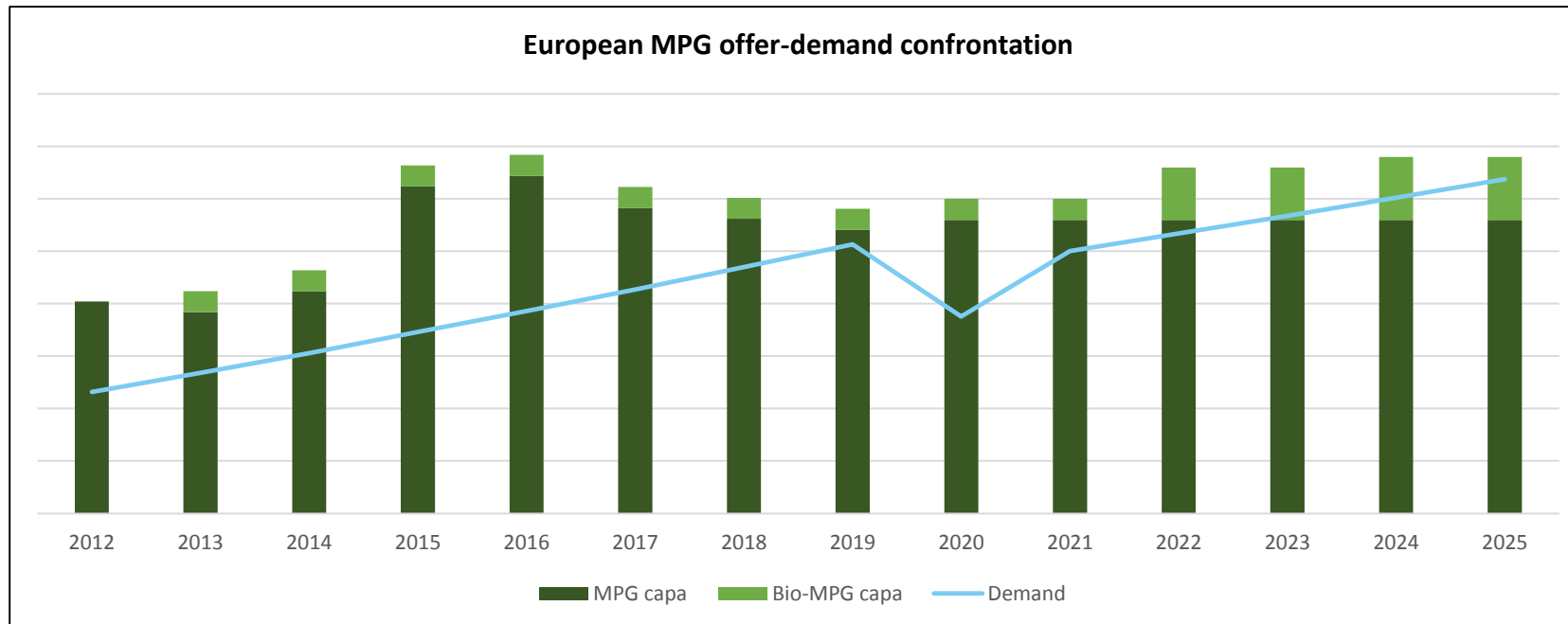
Hydrogenolysis of glycerol to MPG

- Conversion chimique
- Mélange (R)-1,2-propanediol/(S)-1,2-propanediol

Seulement partiellement biologique



Les volumes des différentes productions



Les productions biosourcées vont-elles continuer à augmenter à l'avenir ?

Seule une très petite portion du MPG du marché est biosourcée et sa production s'arrête quand les glycérides sont trop chers.

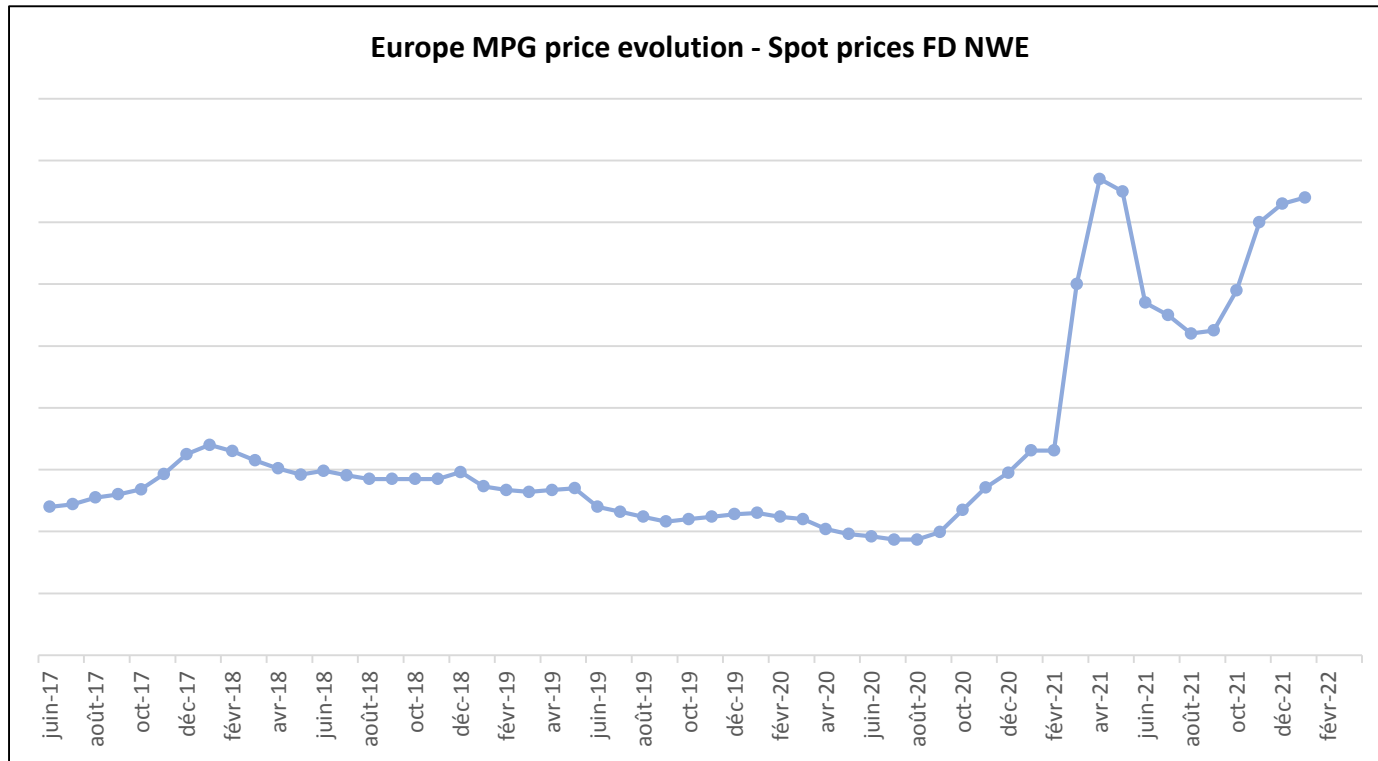
Il ne semble pas y avoir d'investissement dans de la production petrosourcée (à minima en Europe).

2012 – 2016 :
L'augmentation de la production dépasse celle de la demande
→ Les prix sont bas à cause d'une surproduction

2017 – 2025 :
La production se stabilise mais la demande continue d'augmenter ~ 2-3% cagr
→ les prix devraient augmenter et en particulier pour le bio-MPG avec un marché qui s'intéresse aux produits biosourcés

Les éléments du marché

- Evolution du prix, l'explosion de 2021



Les prix se sont envolés en 2021 pour plusieurs raisons :

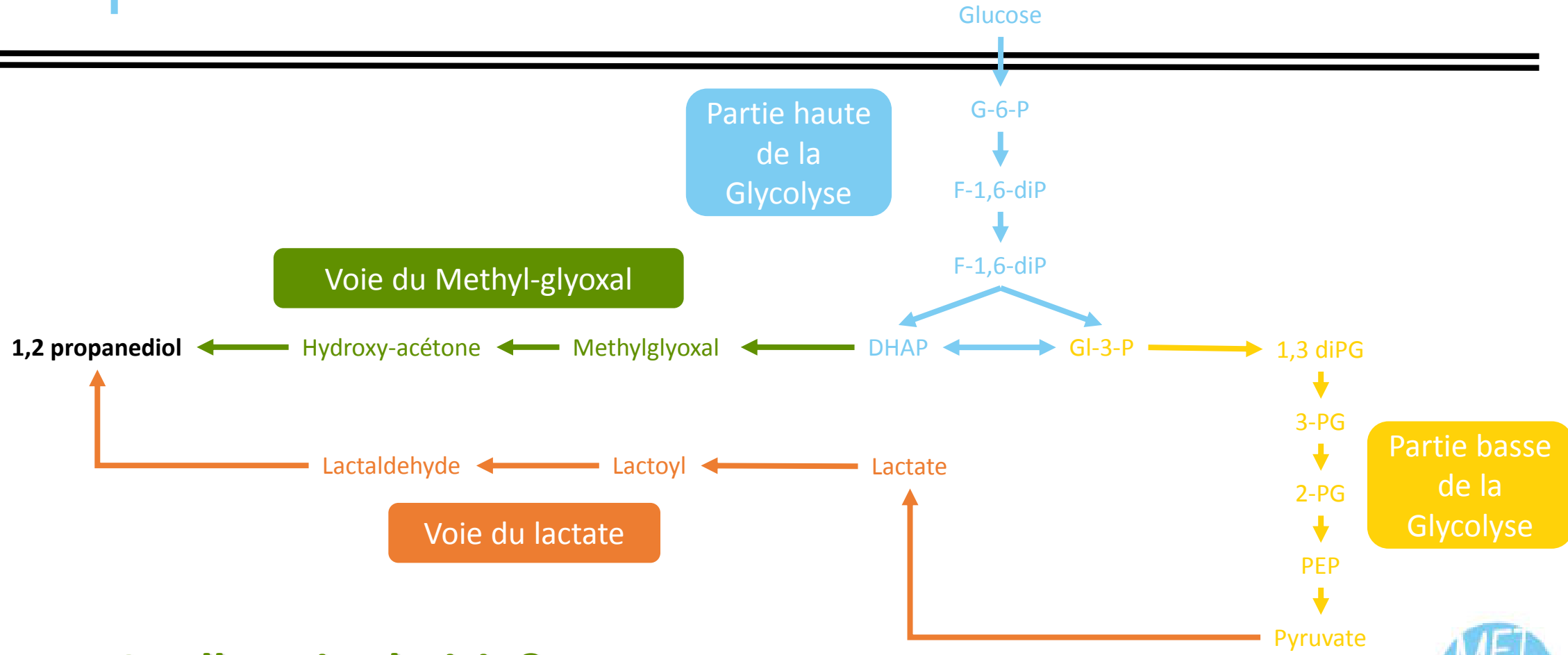
- 1- Une tempête au Texas.
- 2- Un arrêt de production en Chine.
- 3- Une augmentation du coût de la Glycérine.

METEX est parti à la recherche d'une solution 100 % biologique et sans glycérine.



Quelle stratégie métabolique ?

Différentes voies biologiques pour la production de MPG via *E. coli*



Quelle voie choisir ?

**Energie +
Biomasse**



Des choix stratégiques basés sur la recherche de performance

- Critères de sélection de la voie de production du MPG
 - La voie comporte-t-elle des intermédiaires toxiques pour notre *E. coli* ?
 - Le Methylglyoxal est toxique.
 - Le Lactaldehyde est toxique.
 - La voie présente-t-elle des risques de fuite métabolique spécifique ?
 - Le lactate est facilement excrété par les bactéries mais difficilement reconstitué.
 - Quelle est le bilan énergétique / carbone de la voie ?
 - Le bilan énergétique est le même pour les deux voies.
 - Dans les deux cas le niveau d'oxydation du carbone est plus faible pour le MPG que pour le sucre.
 - Nous allons devoir produire des co-facteurs réduits par le cycle de Krebs et donc perdre du carbone.

Pour assurer le meilleur rendement nous avons choisi la voie avec le moins de fuite métabolique.

→ **Voie du Methylglyoxal.**

Le Methylglyoxal : l'intermédiaire toxique de la voie choisie.

- Le methylglyoxal serait le principal agent antimicrobien du miel de manuka



[Foods](#). 2014 Sep; 3(3): 420–432.

Published online 2014 Jul 21. doi: [10.3390/foods3030420](https://doi.org/10.3390/foods3030420)

PMCID: PMC5302252

PMID: [28234328](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28234328/)

The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey

[José M. Alvarez-Suarez](#)^{1,2,*}, [Massimiliano Gasparini](#)¹, [Tamara Y. Forbes-Hernández](#)^{1,2}, [Luca Mazzoni](#)¹ and [Francesca Giampieri](#)^{3,*}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) ► [Disclaimer](#)

This article has been [cited by](#) other articles in PMC.

Abstract

[Go to:](#)

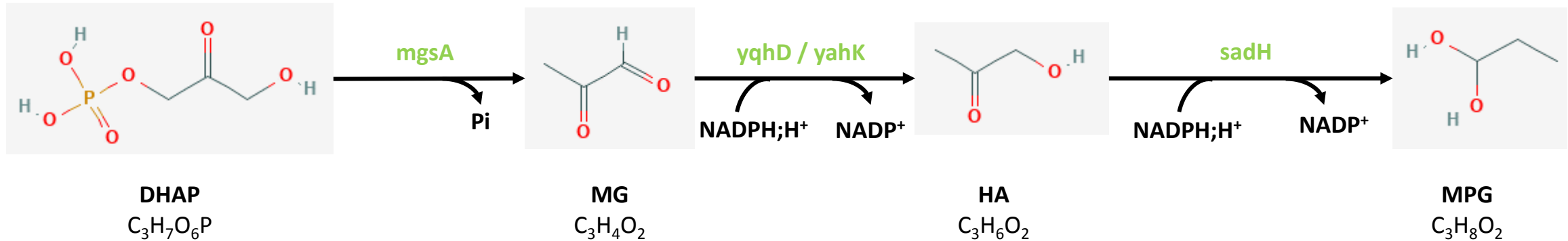
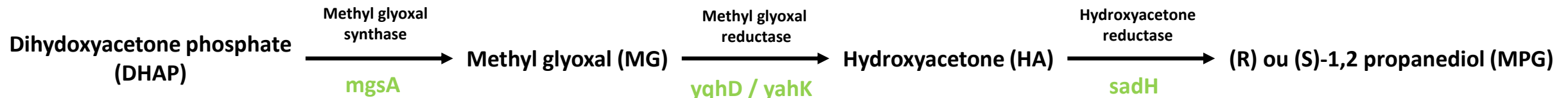
Honey has been used as a food and medical product since the earliest times. It has been used in many cultures for its medicinal properties, as a remedy for burns, cataracts, ulcers and wound healing, because it exerts a soothing effect when initially applied to open wounds. Depending on its origin, honey can be classified in different categories among which, monofloral honey seems to be the most promising and interesting as a natural remedy. Manuka honey, a monofloral honey derived from the manuka tree (*Leptospermum scoparium*), has greatly attracted the attention of researchers for its biological properties, especially its antimicrobial and antioxidant capacities. Our manuscript reviews the chemical composition and the variety of beneficial nutritional and health effects of manuka honey. Firstly, the chemical composition of manuka honey is described, with special attention given to its polyphenolic composition and other bioactive compounds, such as glyoxal and methylglyoxal. Then, the effect of manuka honey in wound treatment is described, as well as its antioxidant activity and other important biological effects.

Keywords: manuka honey, polyphenolic composition, wound treatments, antimicrobial activity



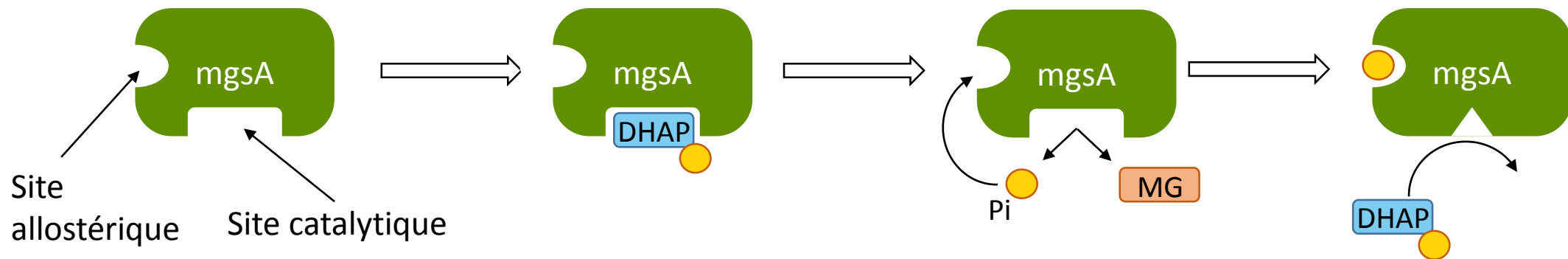
Les défis enzymatiques un travail sur les catalyseurs biologiques

4 enzymes pour la production de MPG à partir du DHAP



MgsA une enzyme avec une régulation allostérique

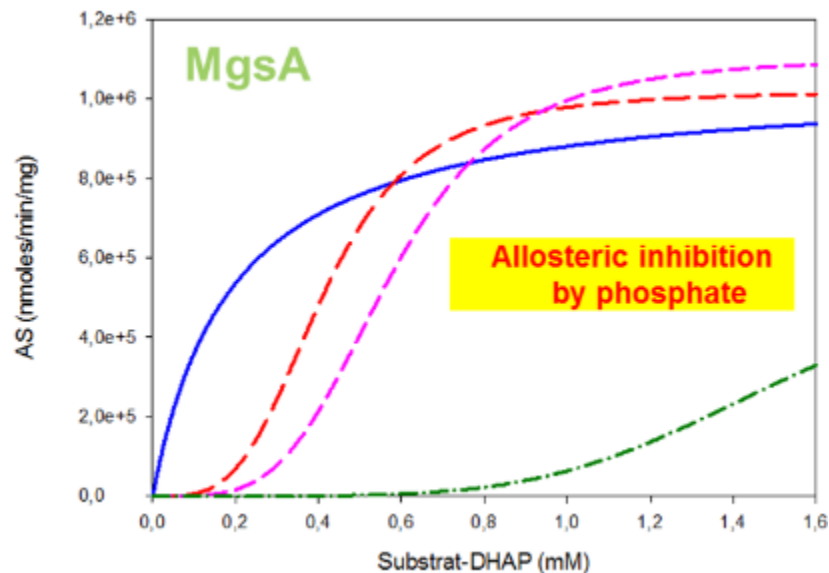
- Une inhibition allostérique par l'un des produits



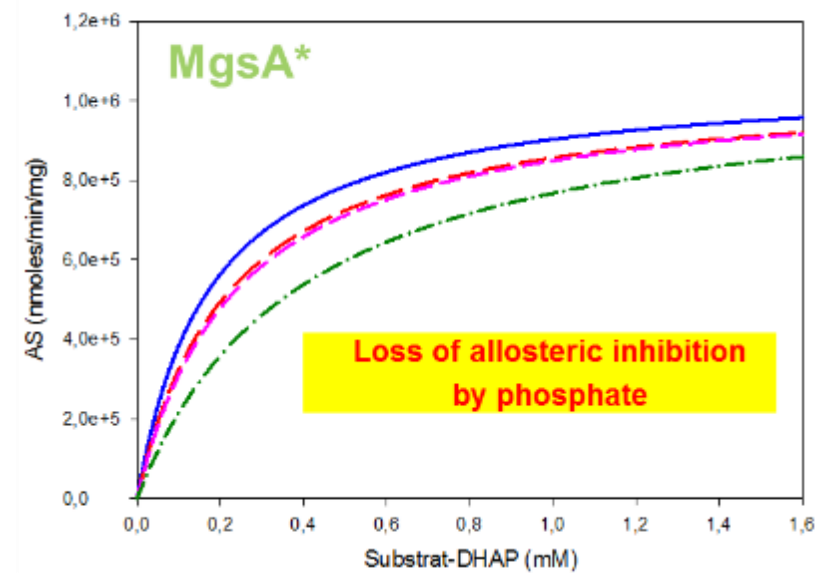
**Il s'agit d'une forme de régulation qui amène l'enzyme à se bloquer lorsque son activité est trop forte.
C'est une stratégie pour limiter l'accumulation de methylglyoxal.**

Vers des versions dérégulées de MgsA

- Mise en évidence de cette régulation et recherche de mutants

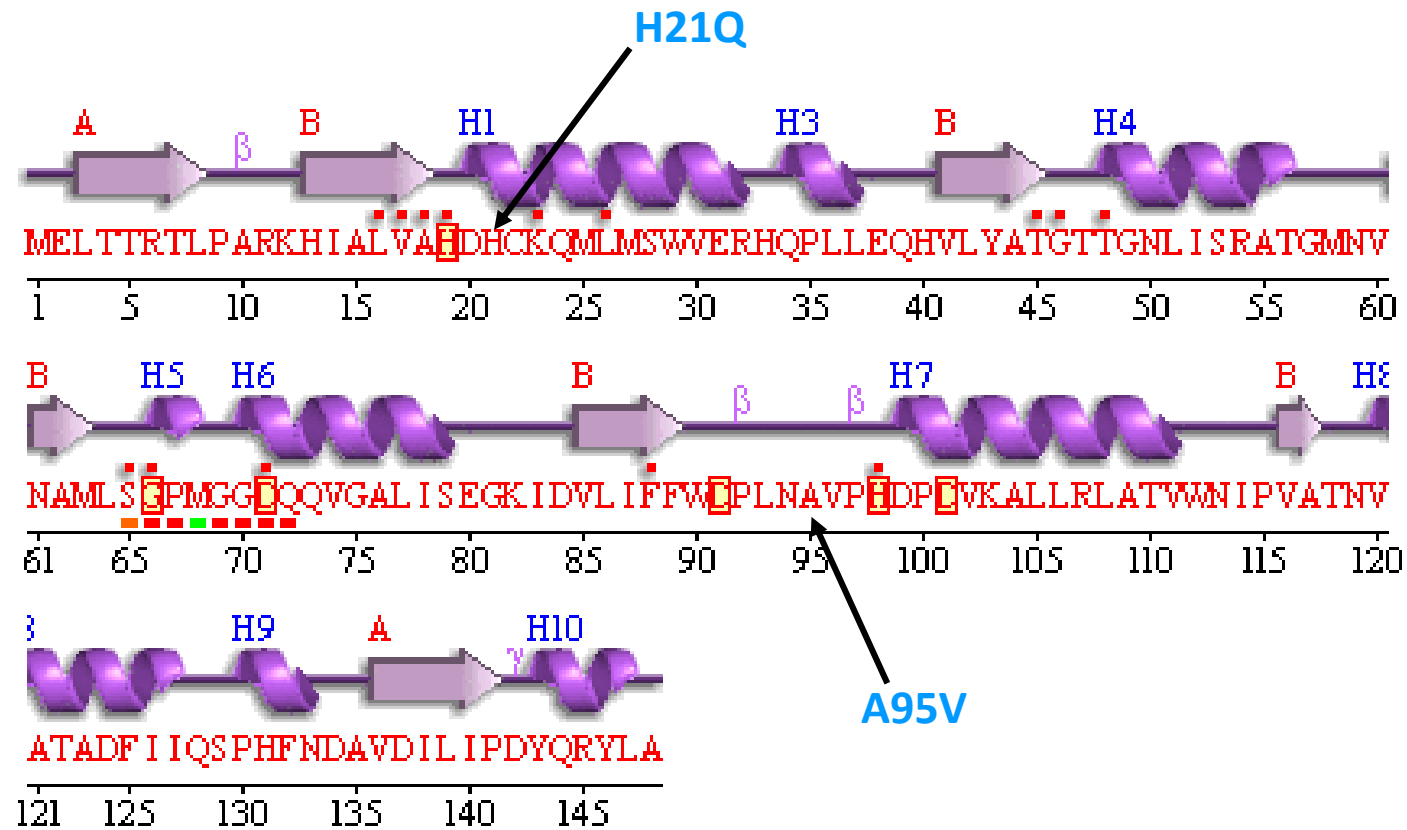


Il y a eu une perte significative d'activité.



Identification de nouveaux mutants avec une dérégulation.

Quels impacts sur la séquence de MgsA ?



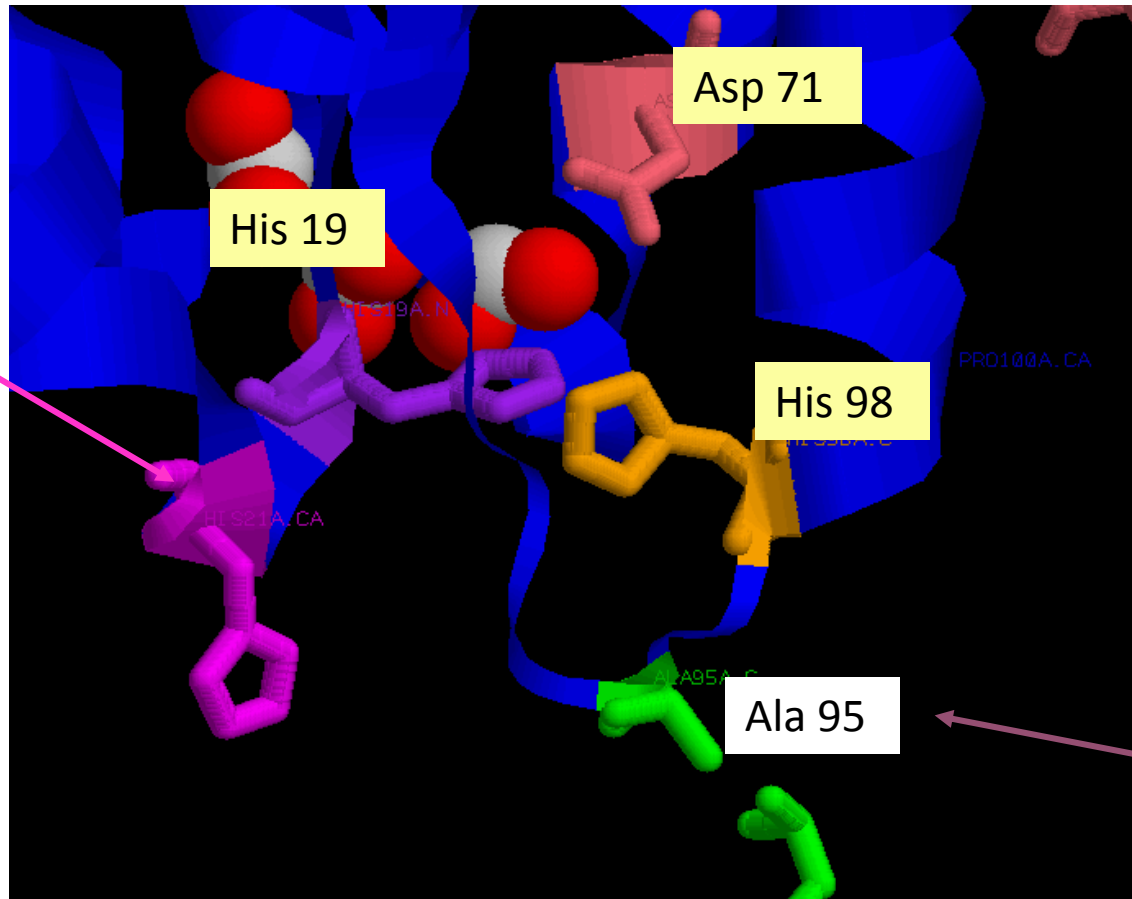
Les deux mutations observées n'affectent ni les résidus catalytiques, ni le site d'interaction avec le ligand.

En Jaune: Résidus du site catalytique
Points Rouge: Interaction avec le ligand

Quels impacts sur la séquence de MgsA ?

Q21?
Semblable a H21:

Très hydrophile
Assez gros

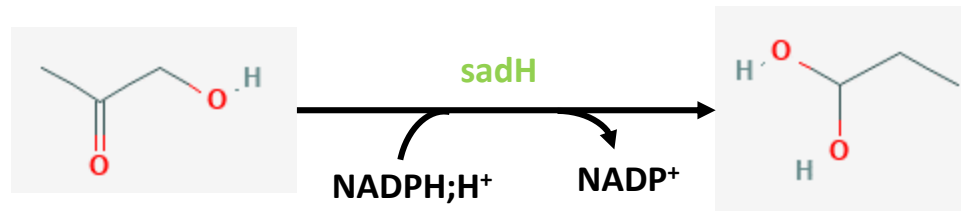


**Les deux mutations
modifient des résidus
proches de l'entrée du site
catalytique.**

V95?
Plus gros
Plus hydrophobe

sadH inhibée par le methylglyoxal

- La dernière étape est très sensible à la présence de Methylglyoxal



HA
 $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$

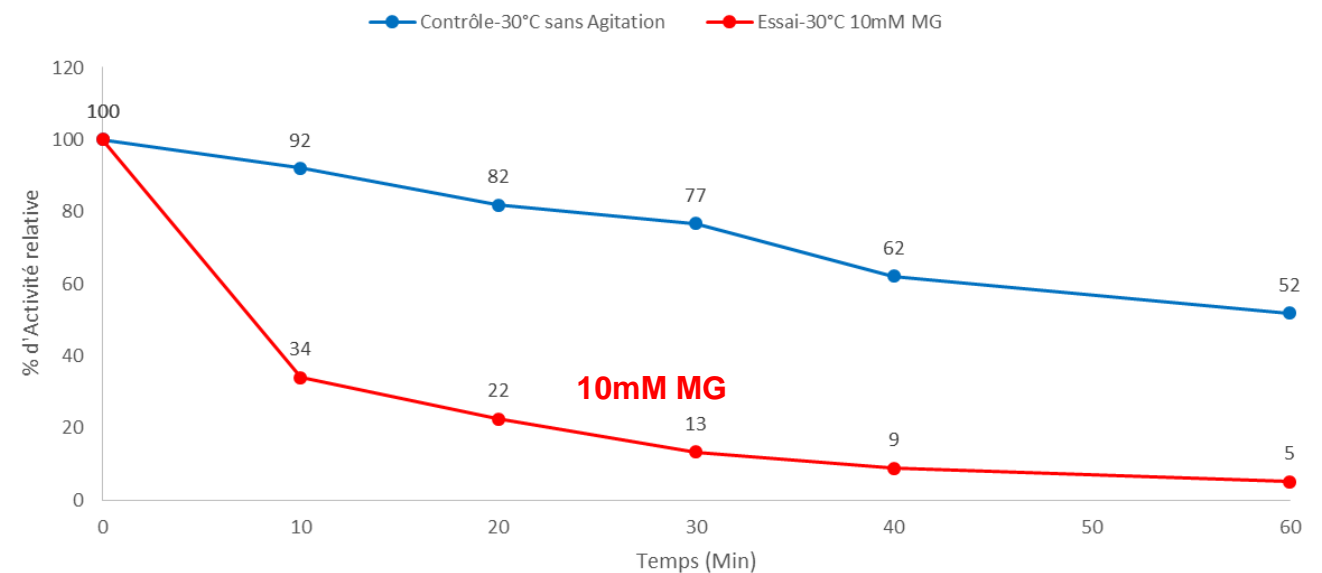
MPG
 $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$

Extrait
enzymatique



Extrait
enzymatique
+ 10 mM
Methylglyoxal

L'activité enzymatique
est mesurée toutes
les 10 minutes



- sadH est une enzyme fragile qui est facilement dégradée et qui est très sensible au methylglyoxal.

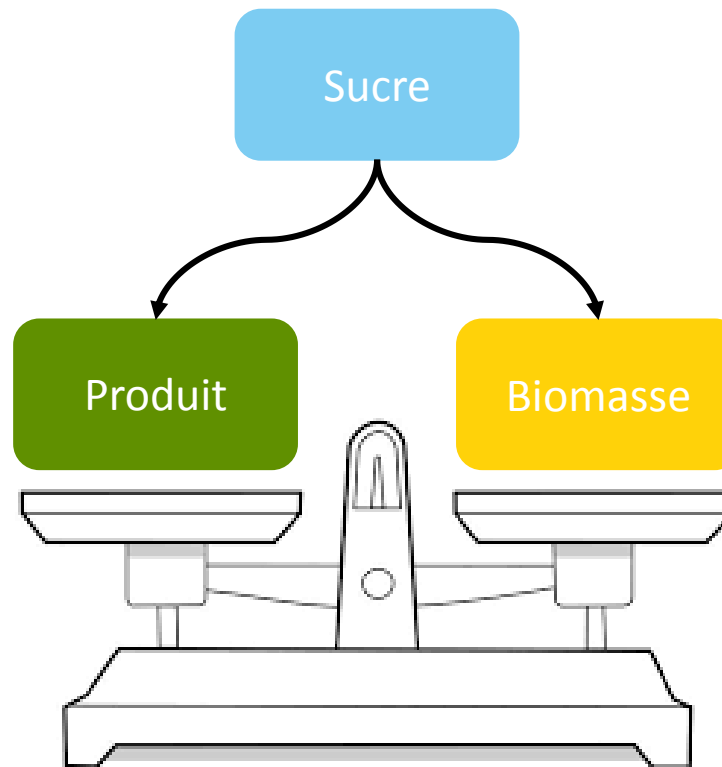


Equilibre des flux métaboliques

L'équilibre des KPIs

- Les 3 KPIs titre / productivité / rendement sont interconnectés

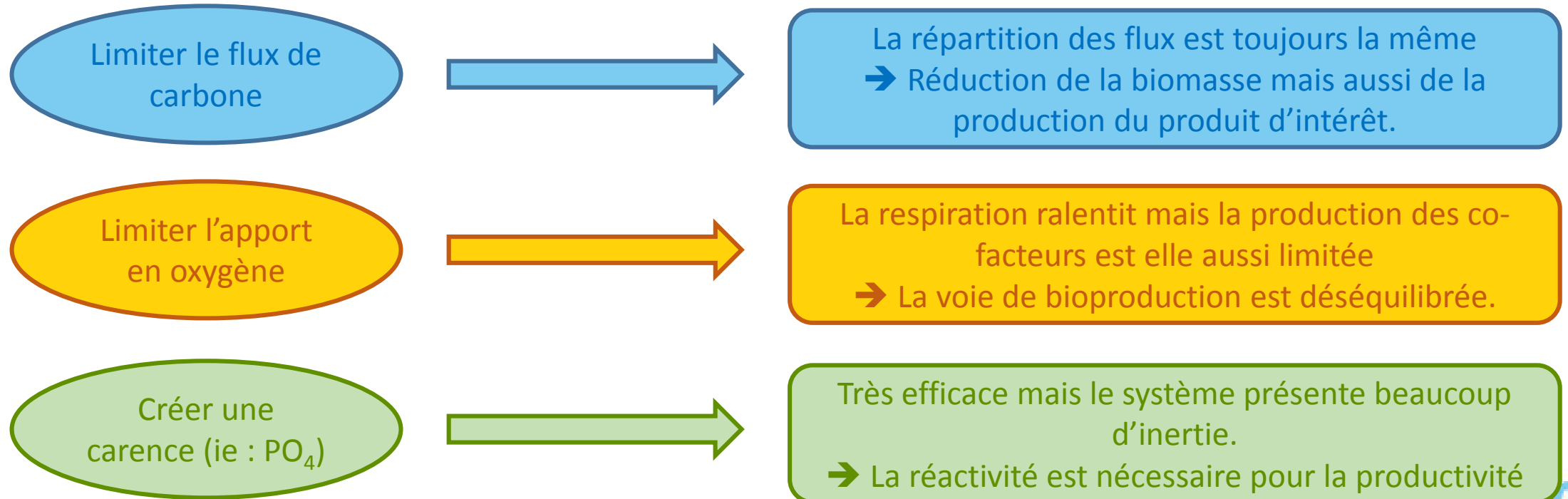
Pas assez de biomasse
→ Perte de productivité car pas assez d'unité catalytique.



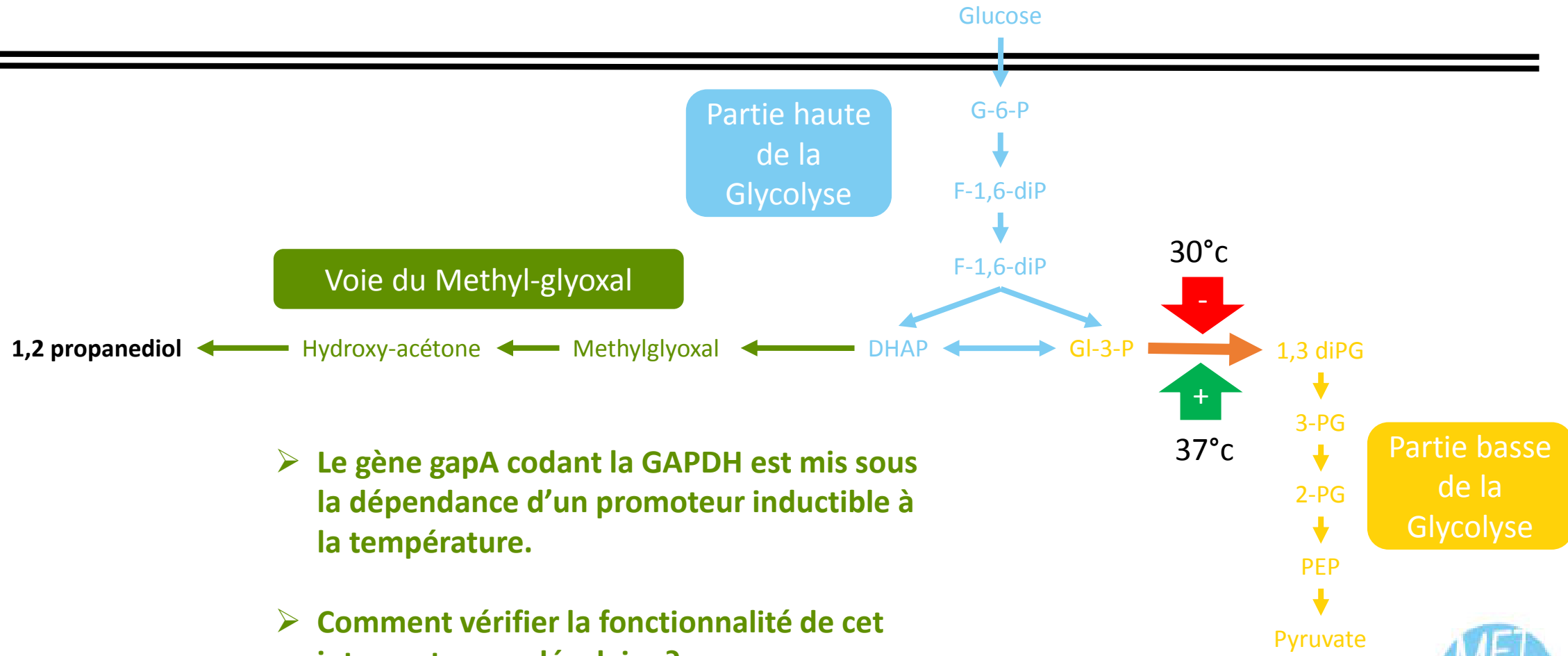
Trop de biomasse
→ Perte de rendement car trop de carbone est consommé.
→ Perte de titre final car trop forte production de CO₂ pour créer plus d'énergie de maintenance.

Contrôle de la production de biomasse par le procédé.

- Limite le flux métabolique globalement

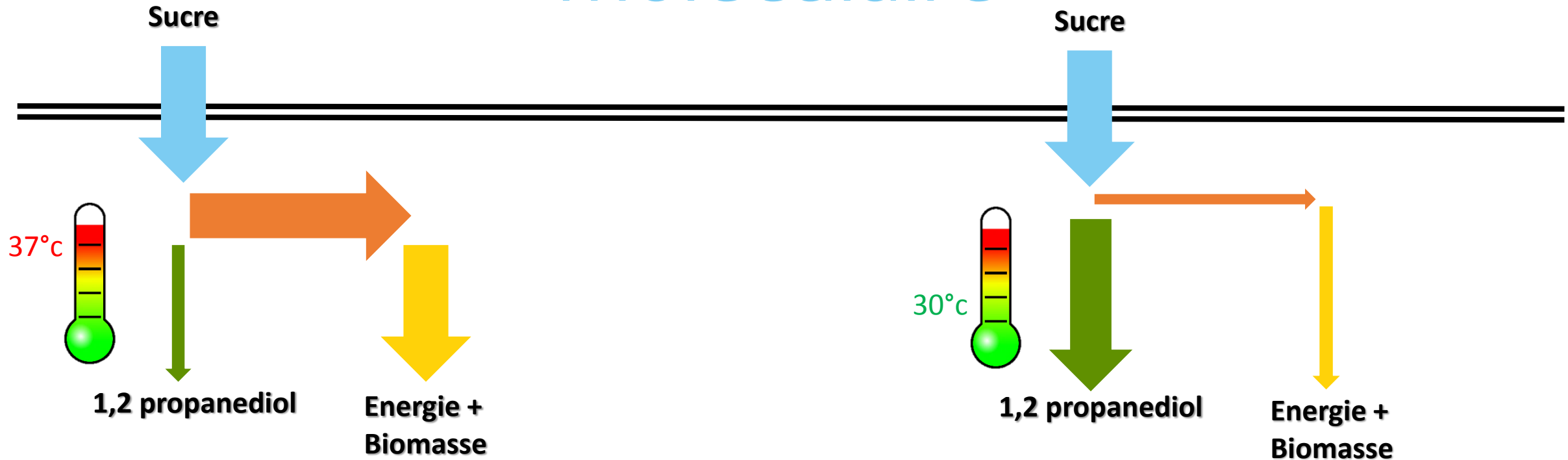


Mise en place d'un modulateur moléculaire



- Le gène *gapA* codant la GAPDH est mis sous la dépendance d'un promoteur inductible à la température.
- Comment vérifier la fonctionnalité de cet interrupteur moléculaire ?

Mise en place d'un modulateur moléculaire

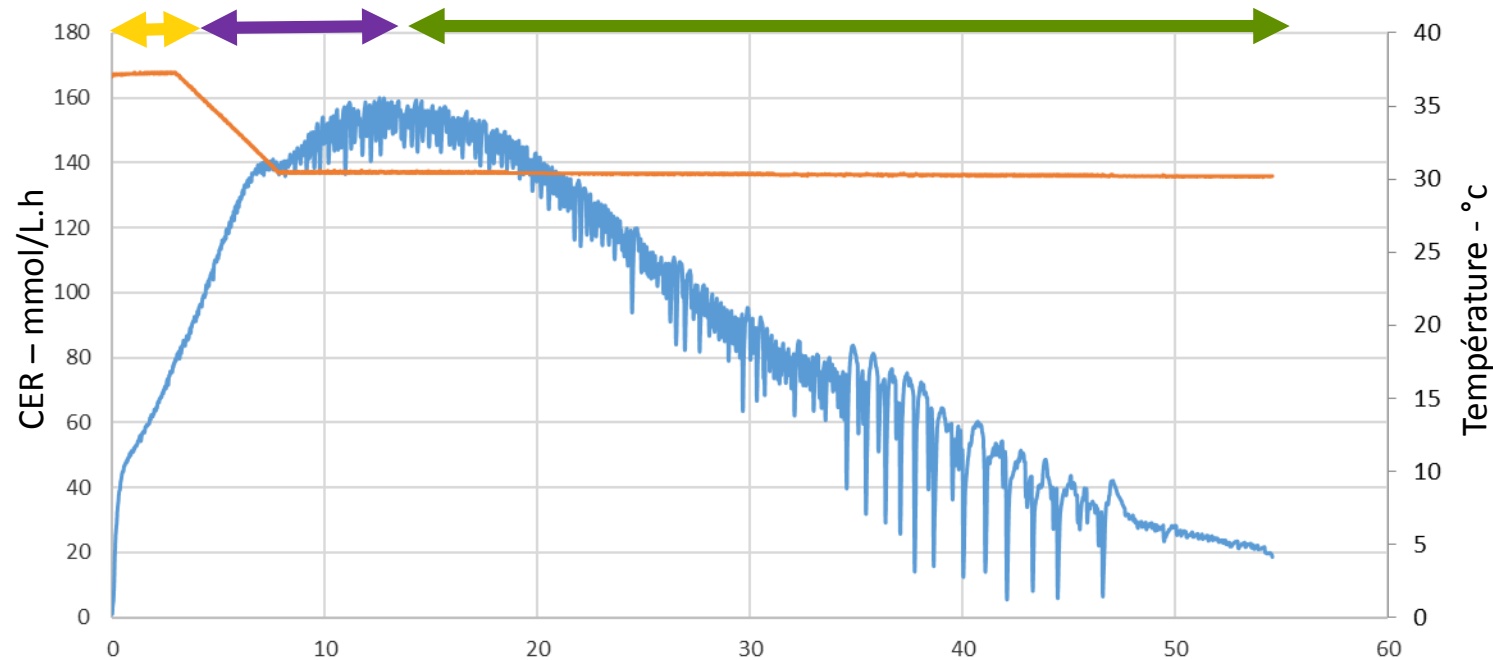


- La fermentation commence à 37°C pour produire la biomasse et du CO₂.
- Peu de production de 1,2 propanediol.

- La fermentation commence à 37°C pour produire la biomasse et du CO₂.
- Peu de production de 1,2 propanediol.

Mise en évidence de la limitation de la respiration

- Production de CO₂ (CER) + Température



3 phases sont visible lors de la fermentation :

1- Production de biomasse, la respiration s'accélère.

2- Phase d'adaptation suite à la baisse de la température.

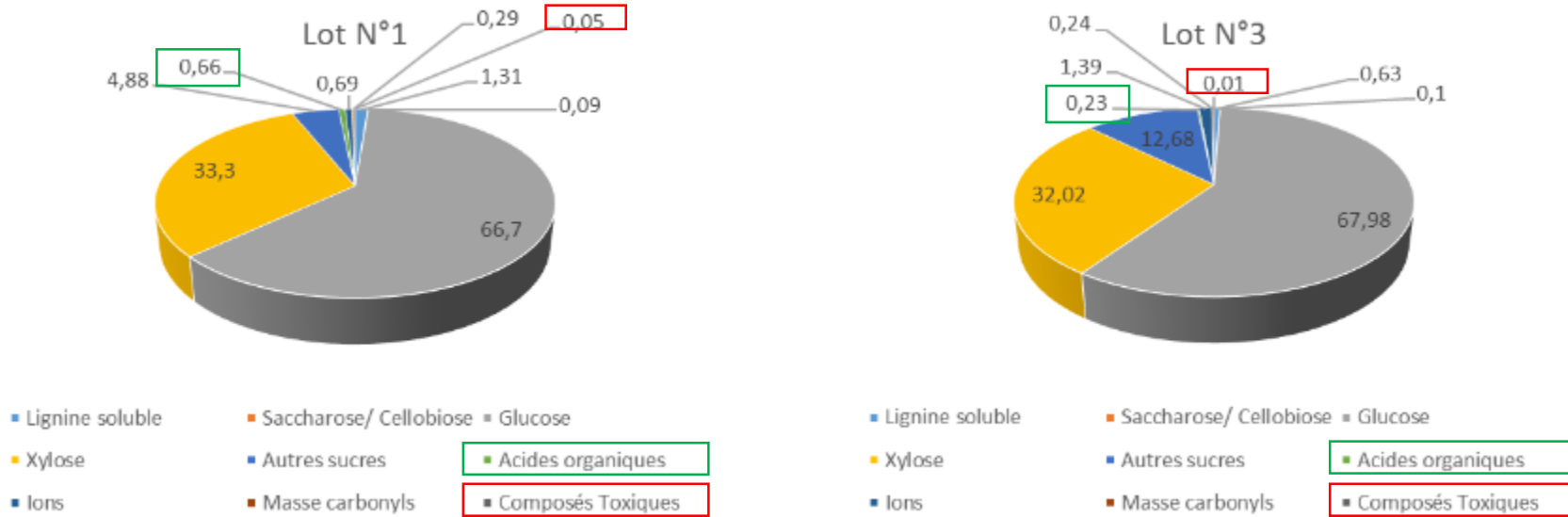
3- La respiration ralentit fortement lors de la phase de bioproduction.



Utilisation de sources de carbone à faible valeur ajoutée.

Les sucres de seconde génération

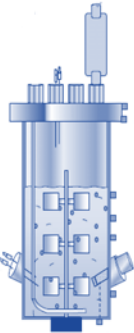
- Composition de substrats réels du marché



- D'un lot à l'autre, les teneurs en inhibiteurs de la fermentation sont assez variables
- La proportion de sucre hors xylose et glucose varie aussi
- On retrouve environ 33 g/L de xylose et 66 g/L de glucose

Une souche résistante naturellement

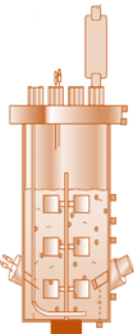
- Croissance et production sur milieu synthétique et Réel



Milieu synthétique

% de DM

- 65 % de glucose
- 32 % de sucrose

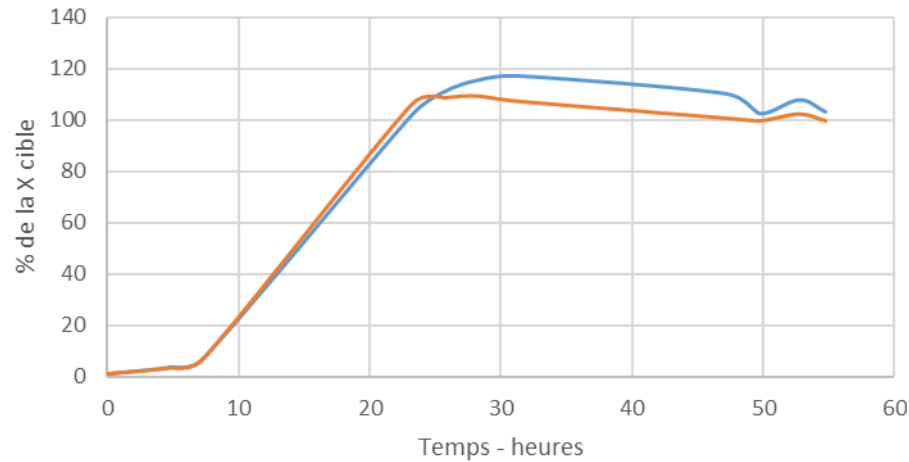


Milieu réel

% de DM

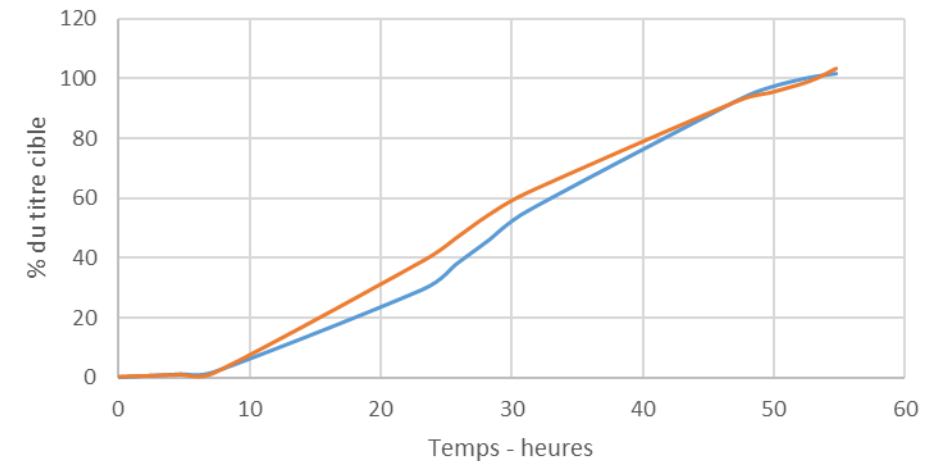
- 60 % de glucose
- 30 % de sucrose
- 8 % autres sucres
- 0,5 % inhibiteurs

Evolution de la quantité de biomasse




- L'effet de l'interrupteur moléculaire est bien visible sur la croissance.

Evolution de la quantité de MPG



- Il n'y a que peu de différences tant sur la croissance que sur la production entre les deux milieux.

➔ La souche semble bien résister aux inhibiteurs



**METABOLIC
EXPLORER**

INDUSTRIAL BIOCHEMISTRY
ALTERNATIVE **NØW**

**MERCI POUR
VOTRE ATTENTION**



WWW.METABOLIC-EXPLORER.COM

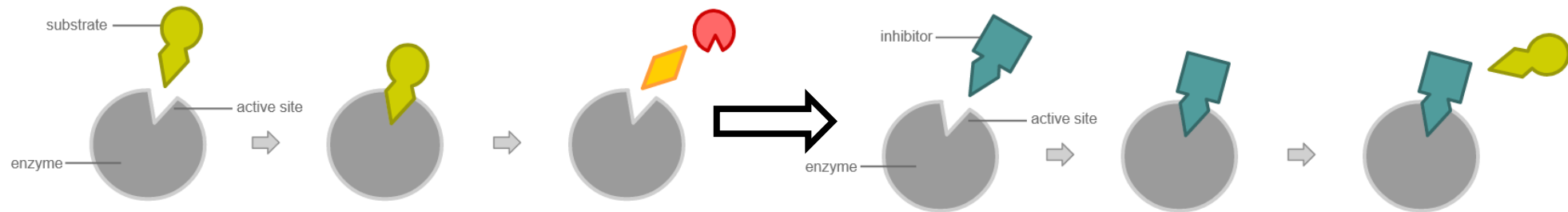


Annexes

Le Methylglyoxal : l'intermédiaire toxique de la voie choisie.

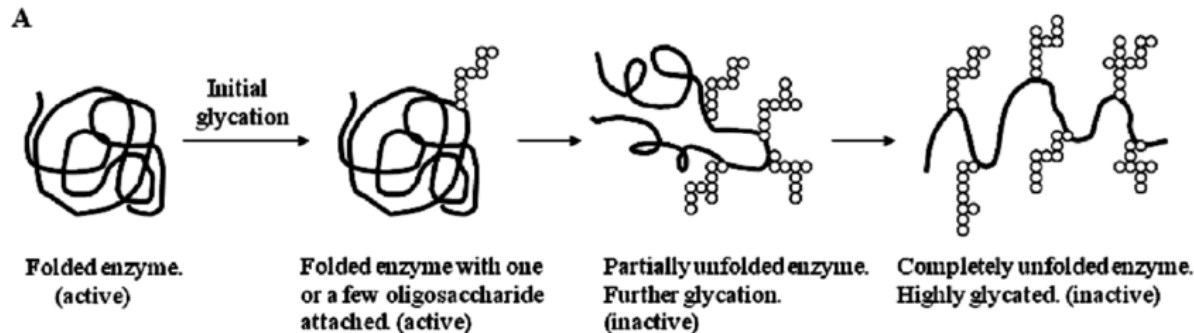
- Plusieurs types de limitation du métabolisme

- Inhibition métabolique classique → Inhibition compétitive des enzymes



Par Mcy jerry de en.wikipedia.org, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=7701646>

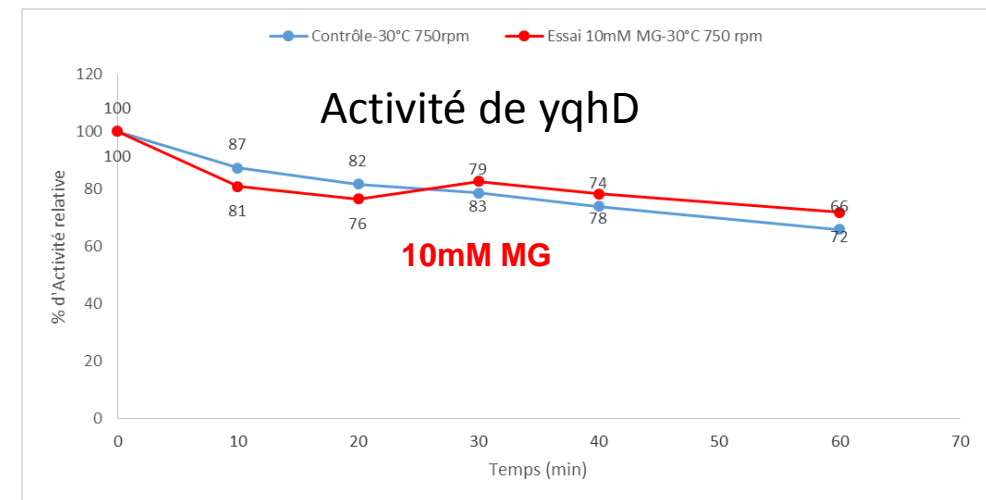
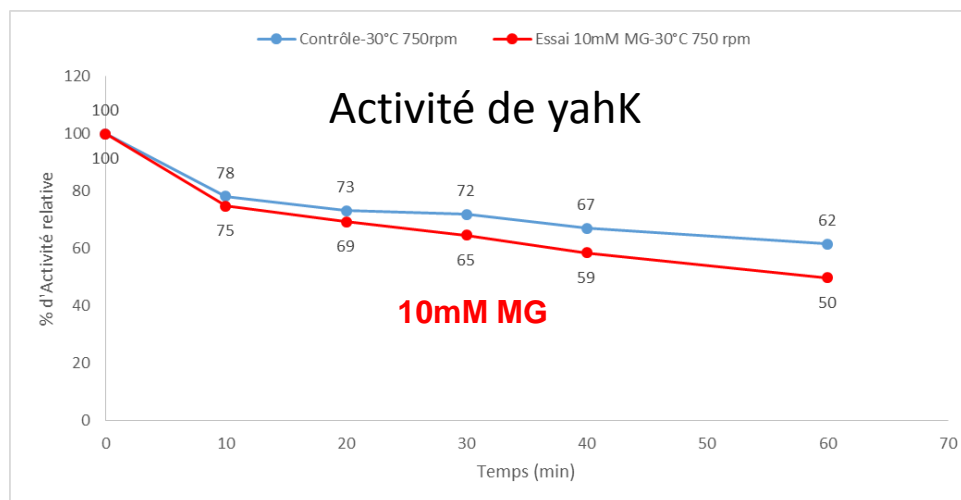
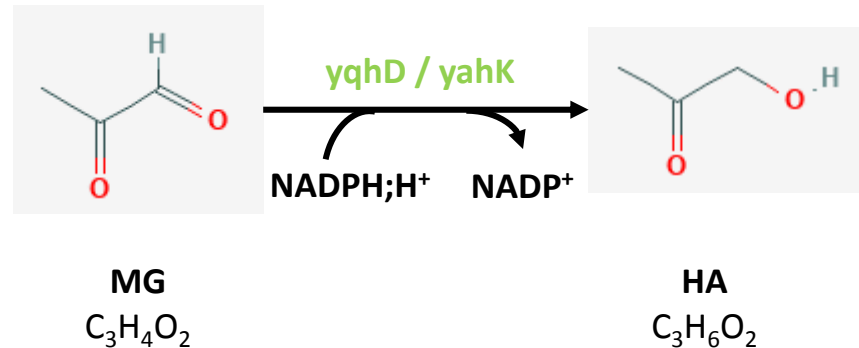
- Le methylglyoxal peut se fixer à certaines protéines puis leur faire perdre leur activité.



Younus, Hina. (2018). Anti-enzyme antibodies: stabilization and therapeutic potential. *Journal of Proteins and Proteomics*. 9. 115-125.

yqhD et yahK ne sont pas inhibés par le methylglyoxal

- Les deux enzymes de la seconde étape ne sont pas sensibles à la présence de Methylglyoxal

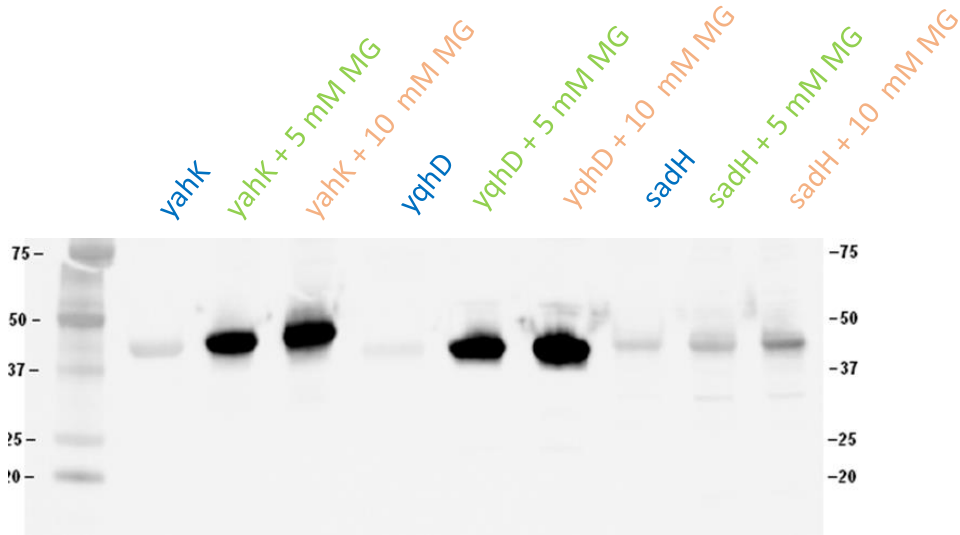


yqhD, yahK ou sadH et la glycation

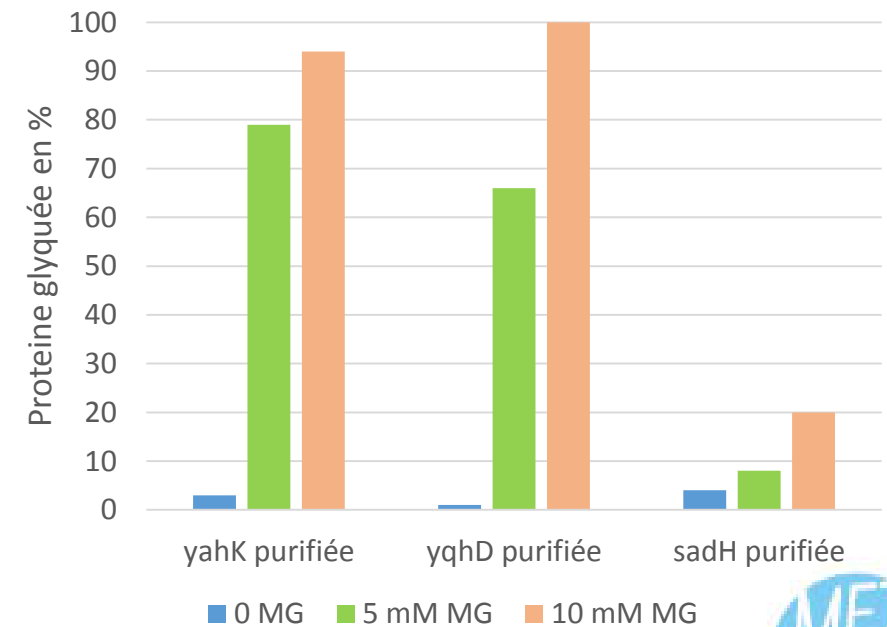
- Etude du taux de glycation des proteines yqhD, yahK et sadH par le Methylglyoxal



Les extraits protéiques sont incubés avec différentes quantités de Methylglyoxal



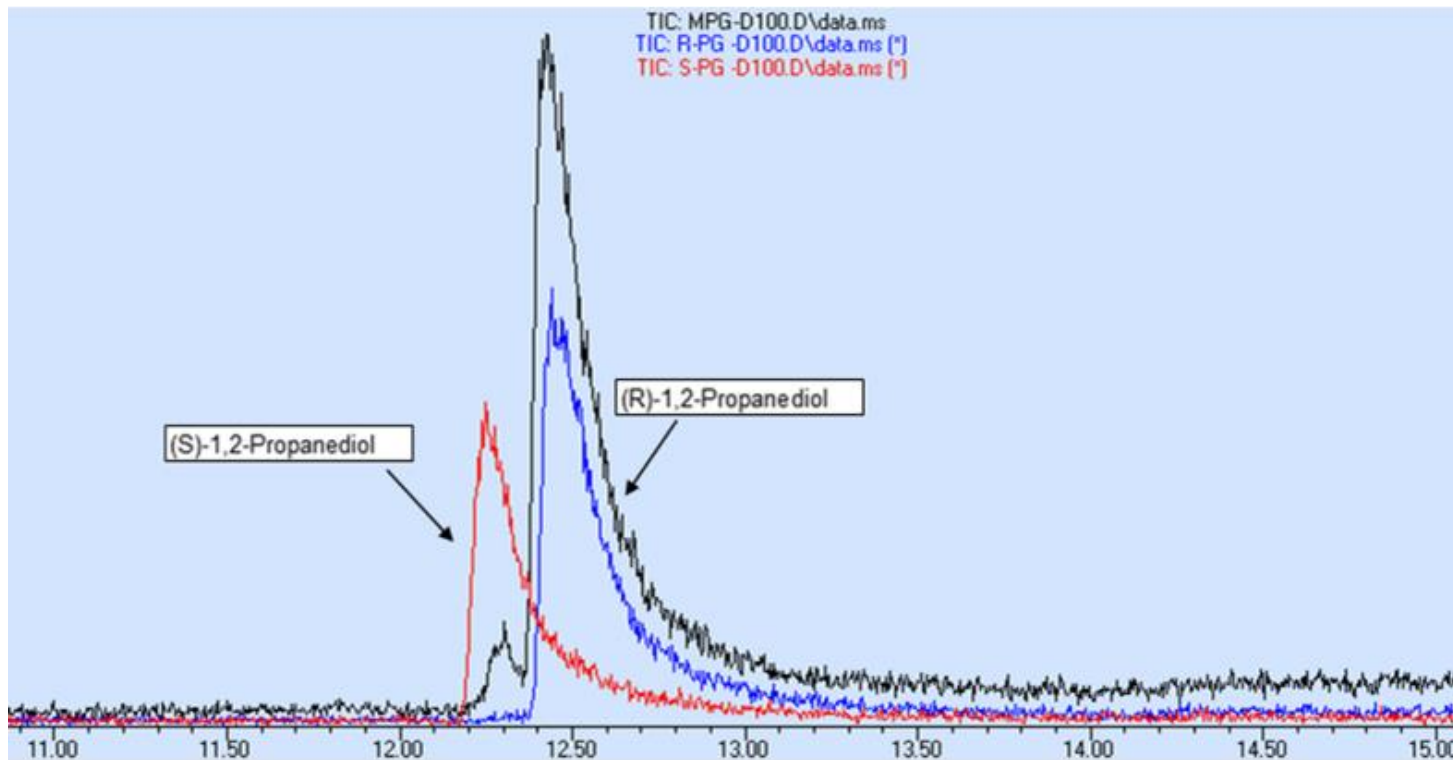
Taux de glycation des protéines



- **sadH** qui est très sensible au Methylglyoxal n'est que peu la cible de glycations.
- **yqhD** et **yahK** sont fortement glyquées mais insensibles au Methylglyoxal.

Nous produisons majoritairement du (R)-1,2 propandiol

- Analyse GC/MS (avec une colonne Chirale)



- Production très majoritaire d'un énantiomère R est due à l'énantiospécificité de sadH.
- Fort intérêt pour l'utilisation enzymatique de notre MPG.
- Il n'y a pas a pas 100 % d'énantiomère R. d'où vient cette racémisation ?