



Programme
interdisciplinaire Energie
du CNRS
2009-2012

Programme de Recherche LIP-ALG

Production de lipides par microalgues : diversité
et influence des conditions de culture

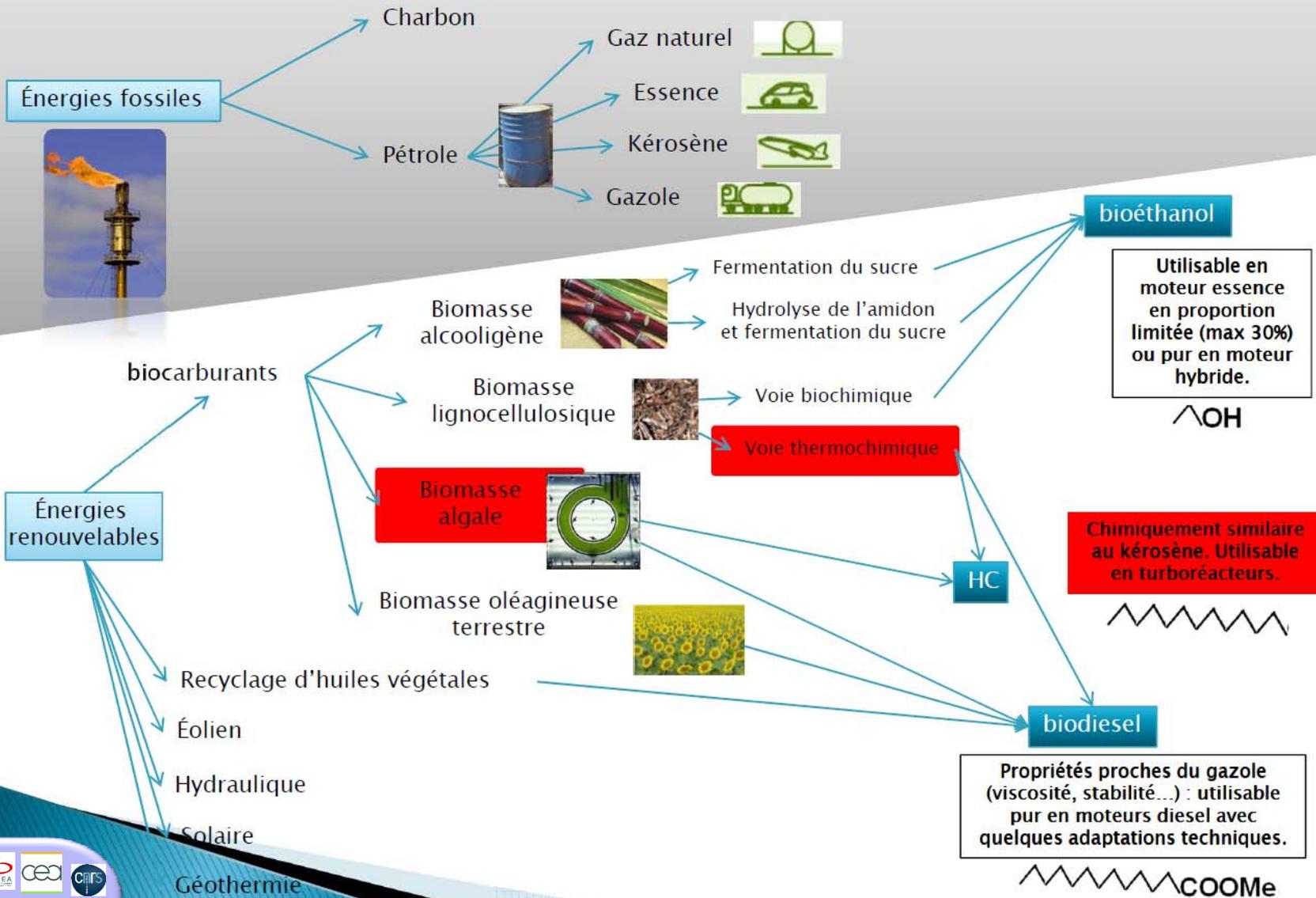
Partenaires du projet :

- GEPEA UMR 6144 (Génie des Procédés-Environnement-Agroalimentaire)
- CEMCA UMR 6521 (Laboratoire de Chimie – électrochimie moléculaire et Chimie analytique)
- CEA Cadarache UMR 6191 (Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues)

Coordinateur J.Pruvost

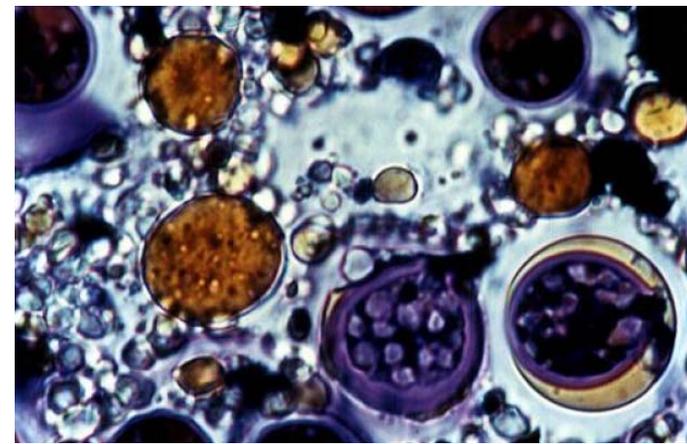
Laboratoire GEPEA – Université de Nantes
jeremy.pruvost@univ-nantes.fr

Quelques généralités...



Quelques généralités...

L'alternative « Microalgue » pour la production de bioénergies...

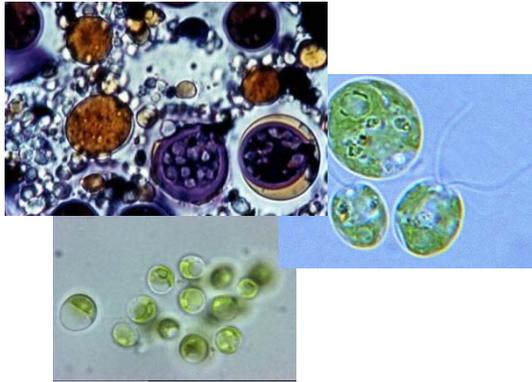


- Vecteurs énergétiques variés : H₂ par biophotolyse directe de l'eau, sucres (méthane, hydrogène par gazéification ou fermentation) et lipides (biodiesel, biokérosène)
- Impact faible, voire nul, sur l'environnement : Bilan carbone, gestion maîtrisée des apports en sels minéraux
- Intensification possible sans augmentation de la pression sur l'environnement (système clos à recirculation)
- Rendements à l'hectare beaucoup plus élevés que pour les végétaux supérieurs (jusqu'à deux ordres de grandeurs) : Solution au problème des surfaces agricoles dédiés aux biocarburants végétaux
- Diversification des voies de production des biocarburants (diminution de la pression sur les filières traditionnelles)

Production contrôlée, industrielle

Production de lipides par les microalgues

Biodiversité importante



Espèces courantes

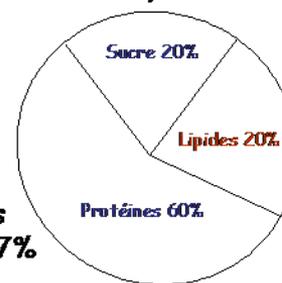
Acides gras	Espèces d'eau douce	Espèces marines
Longueur de chaîne	C16 - C20	C16 - C24
Insaturations	Principalement 2 et 3	2, 3, 4 et 6 (ω -3 source)

Et exceptions... exemple des C34 de *Botryococcus braunii*

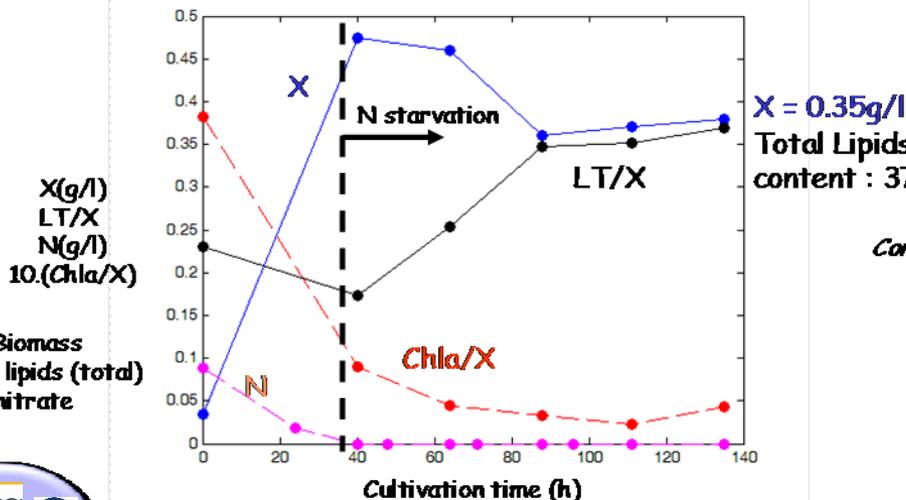
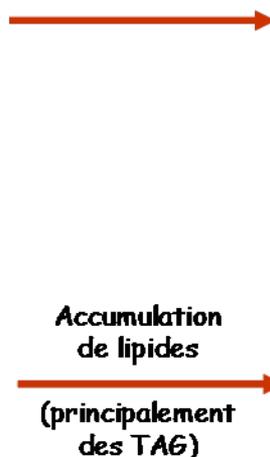
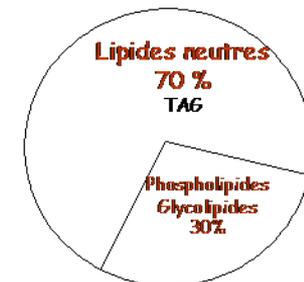
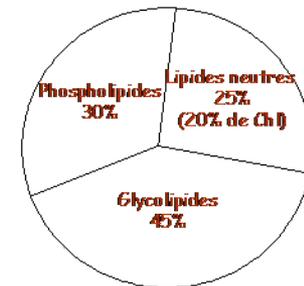
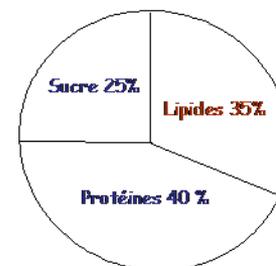
Hydrocarbures : quelques espèces (ex : *Botryococcus braunii*)
 Acides gras : 95 % des TAG
 75 % des phospholipides
 75 % des glycolipides

Forçage physiologique

Conditions classiques de croissance



Conditions de carence azotée



Effets d'une carence en azote (*Neochloris oleoabundans*, Pruvost et al. 2009&2010)



Le programme LIP-ALG

L'application carburant est sensible à la qualité des lipides utilisés

Exemple du Jet-A1

Exigences

Densité énergétique
Tenue au froid
Corrosivité

Contraintes



> 75 % alcanes C_{10} - C_{14} v/v
< 25 % HC aromatiques v/v
< 0,3 % soufre m/m
Densité à 15 °C : 775-840 kg/m³
Point de congélation < -47°C

Objectifs du programme :

- Analyse de la biodiversité : choix de souches aux profils types (eau douce, eau de mer, algues à terpènes), analyse de la variabilité génétique de l'accumulation de lipides neutres au sein d'une même espèce
- Caractériser la diversité des acides gras des 3 classes lipides neutres, glycolipides et phospholipides
- Etudes systématiques en photobioréacteurs pour caractérisation quantitative et qualitative des profils lipidiques et leur modification en fonction des conditions de culture
- Définir des perspectives de production et d'exploitation industrielle (valorisation multiple des lipides issus de microalgues)

Programme de recherche

Exploration de la biodiversité des microalgues (LB3M)

Choix des souches étudiées
Mise en culture des différentes espèces étudiées (genres *Chlamydomonas* et *Chlorella*) et analyse du contenu lipidique

Sélection de deux souches d'intérêt et analyse de leur profil lipidique dans des conditions de croissance variées

Optimisation de la production de lipides chez la ou les souche(s) d'intérêt

Optimisation des conditions de culture (GEPEA)

Validation interlaboratoires des protocoles de mise en culture en photobioréacteurs

Mise en place de la production au GEPEA sur la souche type

Etude de l'algue marine et de l'algue d'eau douce
Botryococcus Braunii

• Etude de l'algue retenue après criblage

• Couplage aval à une extraction biocompatible des lipides

Analyse qualitative et quantitative des lipides (CEMCA)

- Séparation-identification des classes de lipides
- Analyse qualitatives et quantitatives
- Analyse en conditions de cultures « normalisées »
- Analyse en fonction des conditions de culture (ex : carence)

Analyse des hydrocarbures (*Botryococcus*)

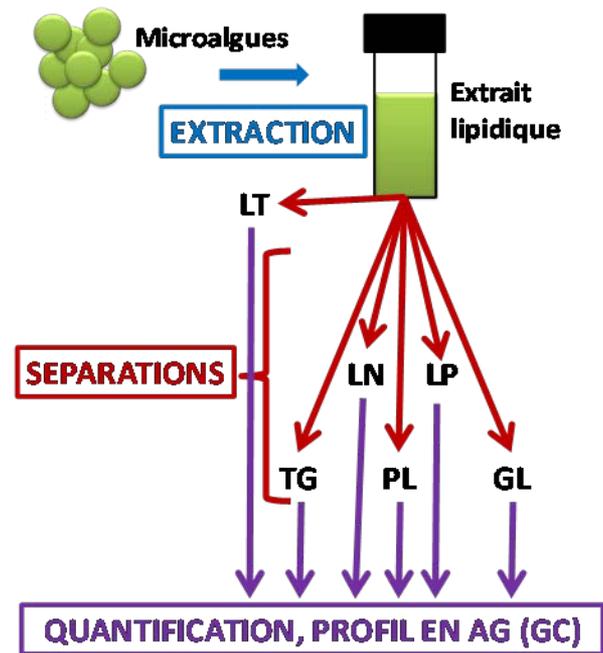
1^{ère} partie du programme : Mise en place d'une méthodologie commune (analyse détaillée des lipides, intercalibration) et des outils méthodologiques (criblage, PBR)

2^{ème} partie du programme : Etudes proprement dites (analyse de la biodiversité, études en PBR)

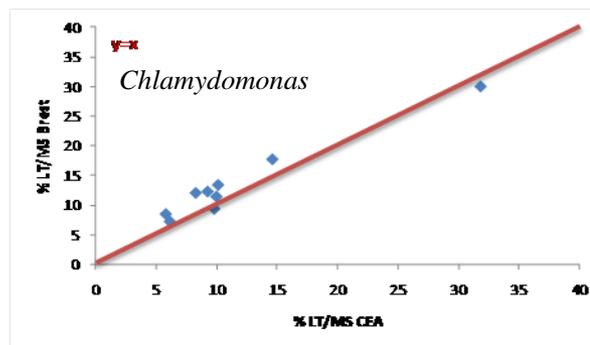
Quelques résultats marquants

Mise en place méthodologique

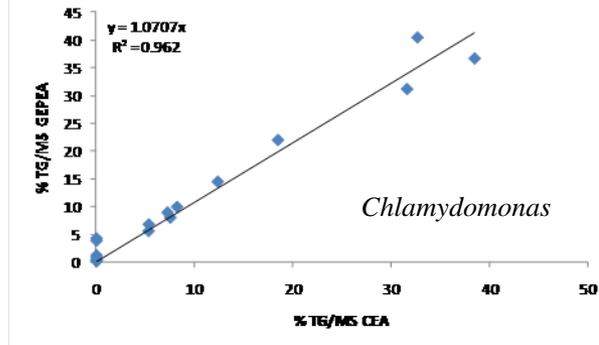
Méthodes analytiques



Développement des méthodes d'analyse et intercalibration sur échantillons donnés (souches marines et eau douce, carencées ou non)



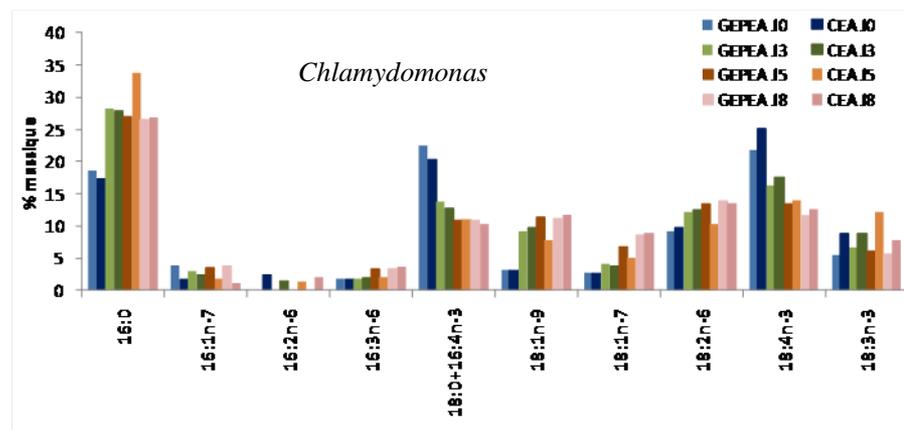
Intercalibration AGLT/MS (extraction)



Intercalibration AGTG/MS (extraction – séparation)

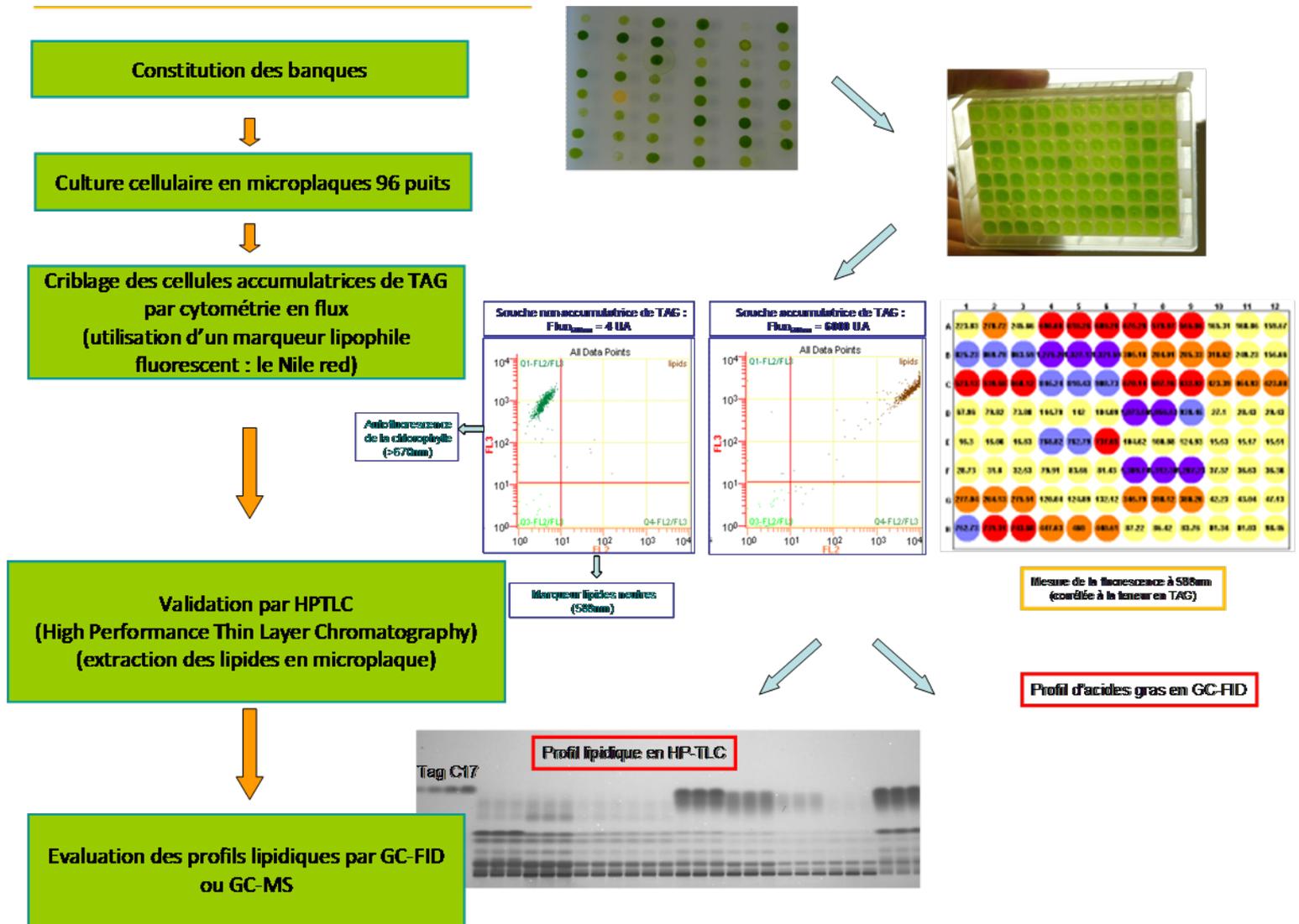
Mesure des lipides totaux, des lipides neutres et polaires, et caractérisation des profils en AG

Intercalibration profils AG des AGTG (extraction – séparation)



Quelques résultats marquants

Mise en place méthodologique

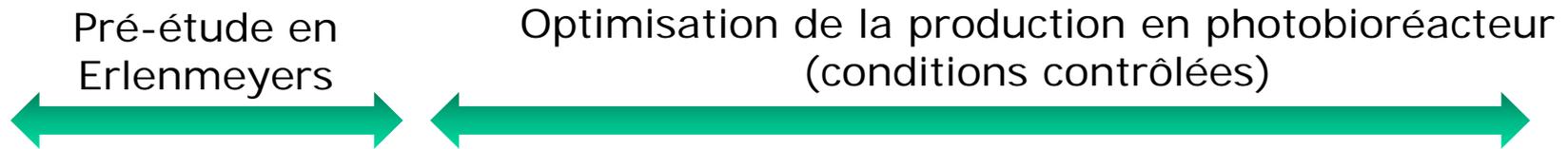


Banc de criblage haut-débit de la biodiversité

Quelques résultats marquants

Mise en place méthodologique

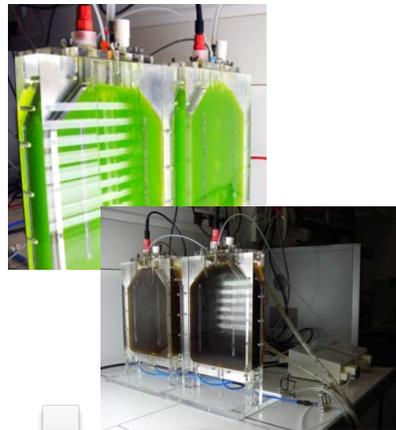
Méthodologie d'étude en conditions contrôlées (PBR)



Mise en culture –
Définition de
milieux



Production en
biomasse
(croissance en
photolimitation)



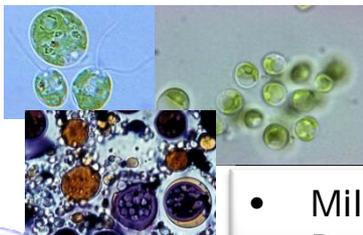
Production de TAG
(forçage physiologique)



1^{ère} extrapolation :
Production de biomasse
→ accumulation de TAG



Choix initial de
souches



- Milieux pour PBR
- Paramètres de culture (pH, T, CID)

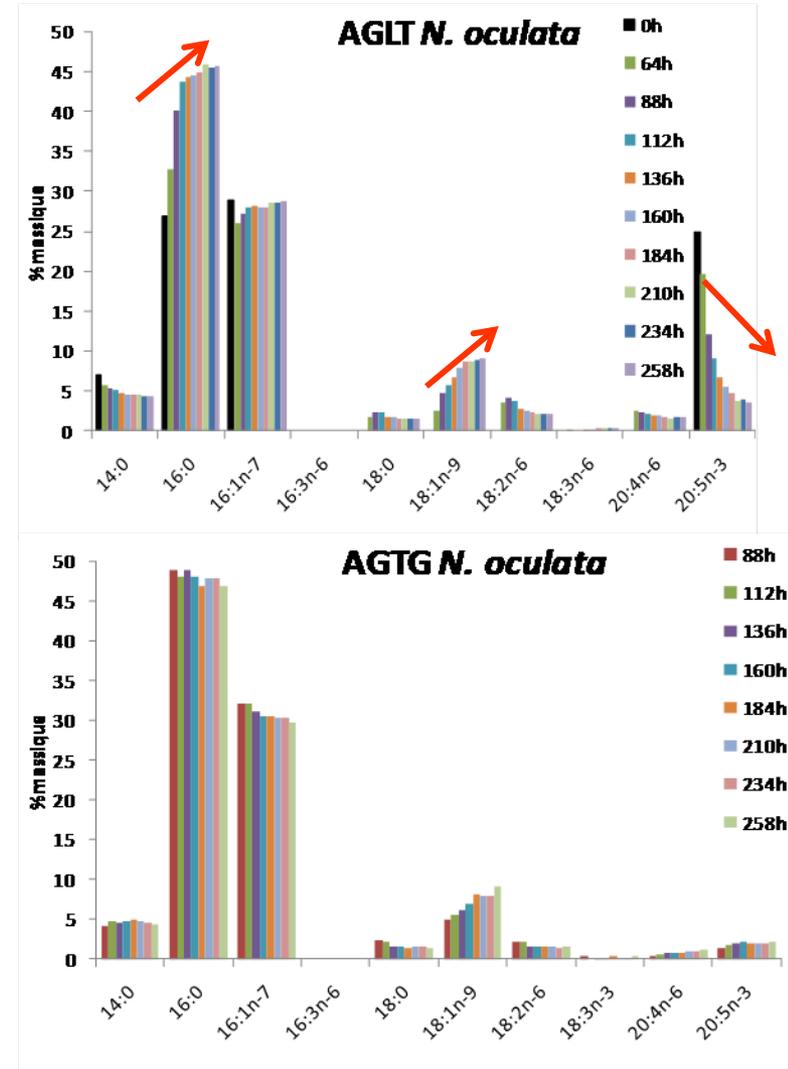
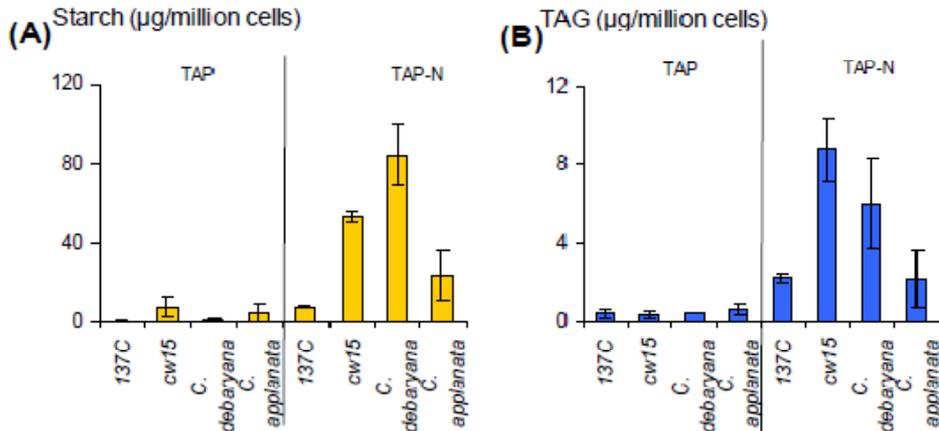
- Protocoles de production
- Productivité en lipides et biomasse

- Quantification (productivité, adéquation qualité lipides-cible carburant)

Quelques résultats marquants

Exploration de la biodiversité des microalgues

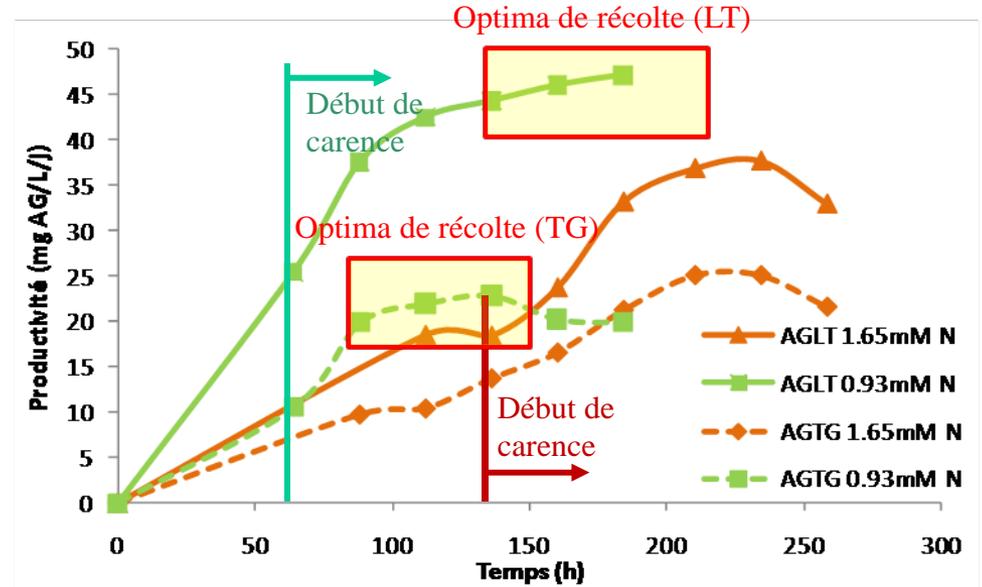
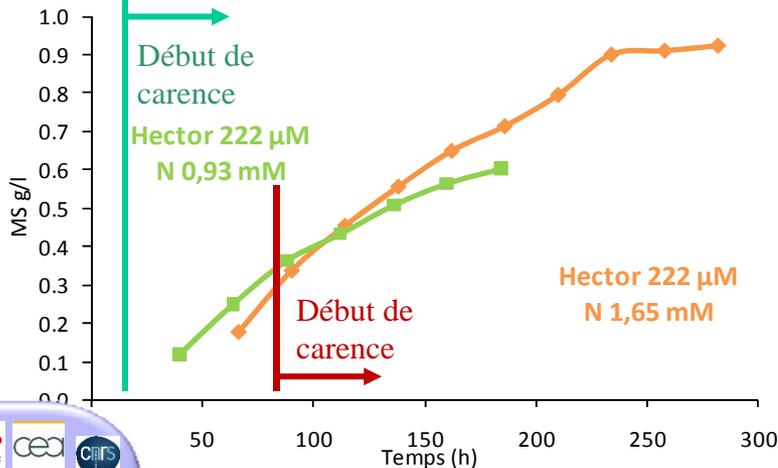
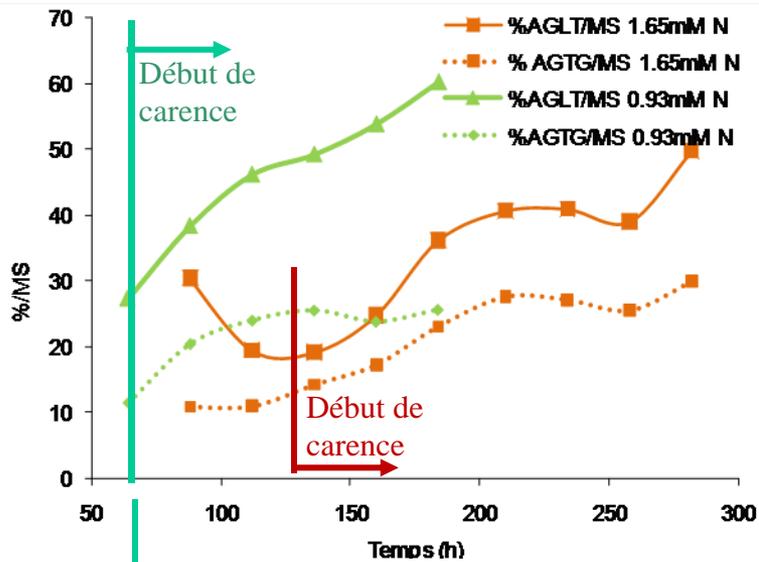
Durée de la carence



- Une carence ou un stress sont nécessaires pour induire l'accumulation de TAG
- Une forte accumulation de sucres n'est pas incompatible avec une forte accumulation de lipides
- Il existe une forte variabilité de la teneur en TAG au sein d'un même genre et d'une même espèce d'algue
- Les TAG contiennent des AG à chaînes courtes et saturées. Leur augmentation en cours de carence est favorable pour des applications biodiesel (notamment pour les souches marines)

Quelques résultats marquants

Optimisation des conditions de culture en vue de la production du ou des lipides ciblés (carence progressive, *N. oculata*, PBR 135L)



Evolution importante du métabolisme en cours de carence

- Augmentation des AG (60%/MS pour LT, 25%/MS pour TAG) et réduction progressive de la croissance
- Obtention d'optima de production et de temps optimum de récolte

Mise en évidence d'un couplage important au transfert de rayonnement et donc « effet réacteur »

- Diminution de l'épaisseur de culture d'un facteur 1,8 \rightarrow augmentation d'un facteur 3 de la productivité en lipides (TAG et LT)

Conclusions à mi-parcours

Outils méthodologiques validés : mesure détaillée des contenus en lipides, banc de criblage, bancs de photobioréacteurs

Premiers résultats encourageants :

- Effet « biodiversité » majeur (y compris au sein d'un même genre)
- Différence significative suivant les fractions lipidiques considérées → besoin de bien définir la cible d'application (TG pour biodiesel, LT pour pyrolyse ?) et l'analyse
- Analyse poussée des fractions lipidiques permet la mise en place d'une optimisation systématique d'une fraction donnée : identification d'optima de production et voies identifiées pour augmenter la productivité en photobioréacteurs

Perspectives

- Criblage élargi de la biodiversité et étude approfondie des effets de la carence pour des algues marines et d'eau douce (mises en évidence et optimisation des paramètres influents en photobioréacteurs)
- Etude de l'intérêt de l'optimisation génétique à l'échelle du procédé de production : productivité atteinte, effet sur les étapes avalées (extraction)
- Analyse : approfondissement (GC-MS au GEPEA) et élargissement (hydrocarbures de *Botryococcus braunii*)
- Mise en perspective des résultats / applications : biokérosène, biodiesel, ...



Bilan à mi-parcours (valorisation)

Liste des publications

- J.PRUVOST, G. VAN VOOREN, B. LE GOUIC, A. COUZINET-MOSSION, J.LEGRAND, Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application, *Bioresource technology* 102, 150-158, 2011.
- M. SIAUT, S. CUINÉ, C. CAGNON, BORIS FESSLER, M. NGUYEN, P. CARRIER, A. BEYLY, F. BEISSON, C. TRIANTAPHYLIDES, Y. LI-BEISSON, G. PELTIER, Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between reference strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology** 11, 7, 2011

Communications

- Pruvost J., Legrand J., Van Vooren G., Le Grand F., Cuiné S., Li-Beisson Y., Peltier G., Marty Y. Programme de recherche LipAlg (PI Energie CNRS) : « Production de lipides par microalgues : diversité et influence des conditions de culture. », Poster aux journées « Algues : filières du futur ! » du 17 au 19 novembre 2010 sur le Parc Technologique Biocitech à Romainville.
- Li-Beisson Y., Nguyen M., Siaux M., Beyly A., Cuiné S., Peltier G. « Variation of oil content in wild-type and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*. » 19th International Symposium on Plant Lipids (ISPL) Cairns, Australia July 2010

Thèses –Master

- Benjamin Moutel, « Optimisation de la production d'hydrocarbures par la microalgue *Botryococcus braunii* pour l'application aux bioaérocarburants », thèse CIFRE EADS-GEPEA, début 1/11/2010.
- Claire Ripert, « Etude d'une souche suraccumulatrice de lipides », rapport de Master 2, Paris 6, Juillet 2010 (stage au GEPEA).
- Caroline Cagnon, « Etude de l'accumulation des réserves de triacylglycérols et d'amidon dans des **souches mutantes et sauvages** de *Chlamydomonas reinhardtii*. Comparaison de deux méthodes de dosage de la teneur en chlorophylle: spectrophotométrie et cytométrie en flux" **Master 1** "Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologie" (MBVB), Université d'Aix en Marseille 2, Marseille (**stage au LB3M**)
- Boris Fessler, “Study of lipid and starch accumulation in the model green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* », rapport de Master 2, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg. Juin 2010 (stage au LB3M)



Programme de Recherche LIP-ALG



Programme
interdisciplinaire Energie
du CNRS
2009-2012



Merci pour votre attention

Personnes impliquées:

GEPEA

- F.Le Grand
- J.Legrand
- J.Pruvost
- G.Van Vooren

LB3M

- G.Peltier
- Y. Li-Beisson
- S. Cuiné
- M. Nguyen

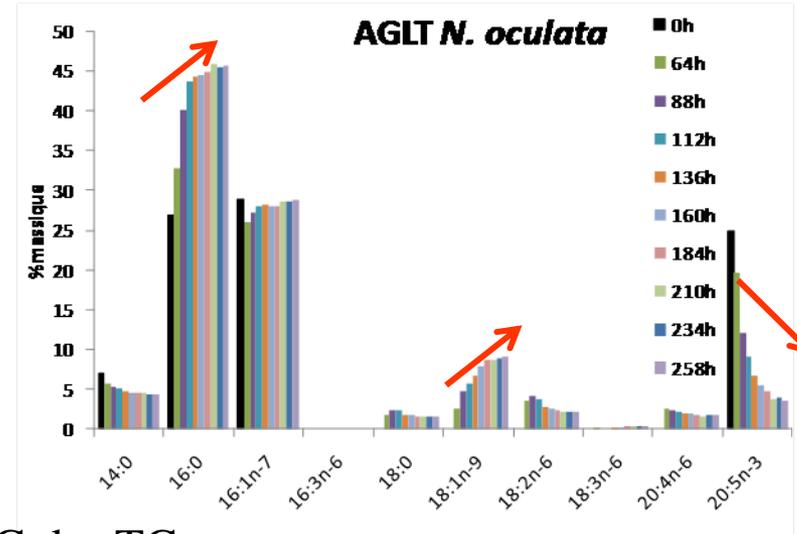
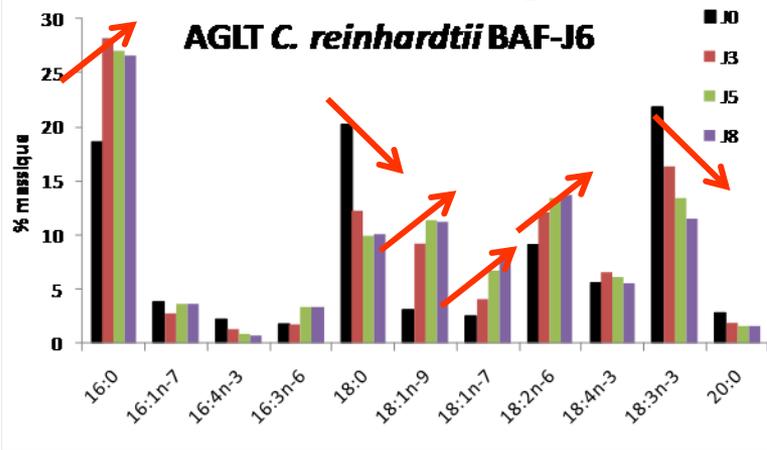
CEMCA

- Y.Marty

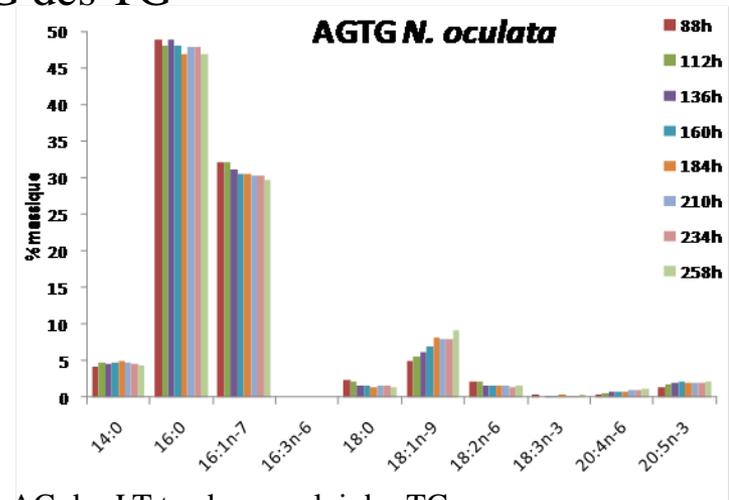
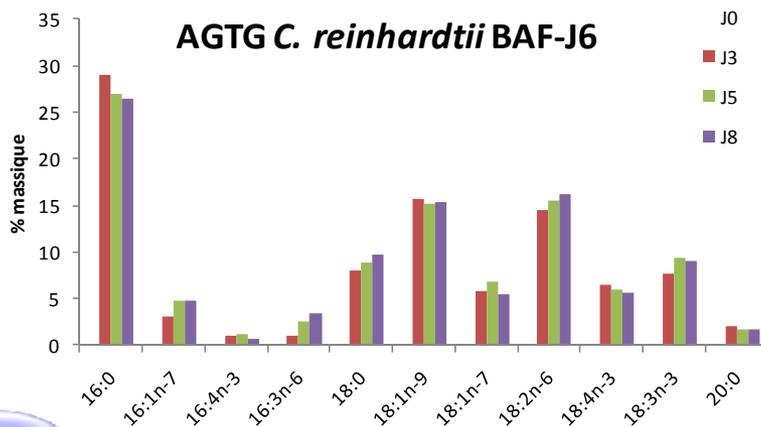
Quelques résultats marquants

Optimisation des conditions de culture en vue de la production du ou des lipides ciblés (carence progressive, *N. oculata*, PBR 135L)

➤ Modification de la composition en AG des LT



➤ Peu ou pas d'évolution de la composition en AG des TG



La proportion de TG au sein des LT augmentant, le profil en AG des LT tend vers celui des TG
 Diminution du degré d'insaturation des LT (favorable à une application biodiesel mais pb des PL si transestérification)