



Point d'avancement du projet ALPO

Voortgangsoverzicht van het ALPO-project

Valorisation des co-produits de microalgues par fermentation

Les microalgues présentent de nombreux avantages. L'un des intérêts majeurs est la capture et la conversion du CO₂ atmosphérique en biomasse et molécules d'intérêt. Ces molécules d'intérêt varient selon l'espèce de microalgue étudiée. Elles peuvent être utilisées dans le domaine nutraceutique, pharmaceutique, énergétique ainsi que pour la synthèse chimique. Dans le cadre du projet ALPO, deux espèces ont été sélectionnées : *Chlorella vulgaris* qui possède la capacité de stocker des acides gras et *Arthrospira platensis* qui accumule des polysaccharides.

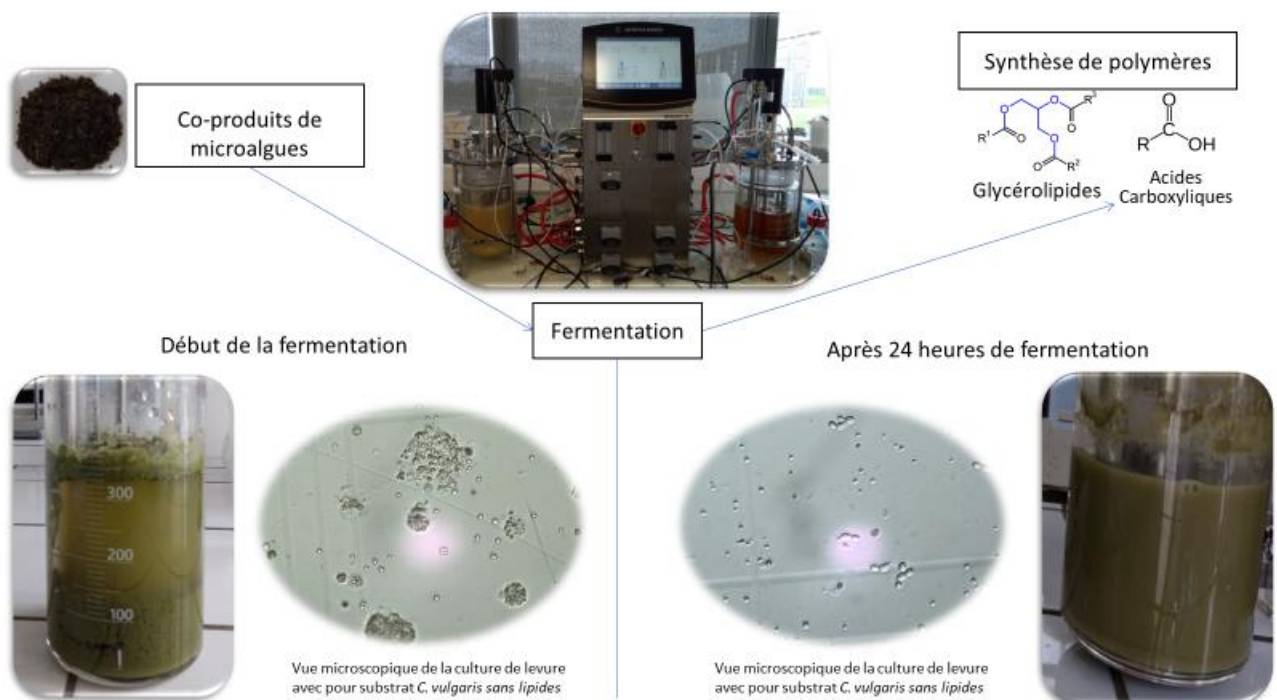


Figure 1 : Schéma représentant la transformation du co-produits de microalgues en glycérolipides et acides carboxyliques pour la synthèse de polymères

Ces fractions font l'objet de recherche au sein du projet ALPO pour être valorisées sous la forme de synthons pour la production de polymères biosourcés (Newsletter 2). Les composés n'entrant pas dans la synthèse des polymères sont valorisés par fermentation. L'objectif est de diminuer l'impact environnemental et le coût du procédé. Compte tenu du taux d'humidité de la biomasse, la fermentation en milieu liquide apparaît comme la solution la plus intéressante. De plus, elle permet de produire des molécules à forte valeur ajoutée tout en évitant des étapes coûteuses (énergétiquement et économiquement) d'évaporation d'eau du substrat de microalgues.

Pour répondre aux problématiques imposées par le substrat, il a été choisi de travailler avec les levures oléagineuses. *Yarrowia lipolytica* est promis à un fort avenir dans les bioraffineries. Cela justifie en partie son choix dans le projet (Adrio, 2017; Lopes et al., 2017). Cette souche permet de venir compléter qualitativement et quantitativement les acides gras produits par les microalgues. De plus, cette levure est capable de métaboliser une grande variété de substrats allant des sucres aux hydrocarbures, permettant une certaine flexibilité au niveau du choix de la technique utilisée pour extraire les composés des microalgues.

Les résidus issus de l'extraction des lipides de *C. vulgaris* ont fait l'objet de tests de fermentations (Fig 1). Ils ont permis de mettre en évidence une croissance de *Y. lipolytica*. Une absence de changement significatif dans les paramètres de croissance de la souche par rapport à son substrat de référence a également été démontrée. Il a été également remarqué une meilleure dispersion du substrat au cours de la fermentation ainsi qu'une diminution en taille des agrégats de *C. vulgaris* (Fig 1). Les lipides produits sur ce substrat sont intéressants d'un point de vue qualitatif. Une investigation plus poussée est en cours afin d'identifier exactement le contenu lipidique. La production de lipides par la souche testée n'étant pas concluante, une souche génétiquement modifiée et dérivant de la première souche a été testée. Le rendement de production des lipides a bien été amélioré sans variation du profil lipidique entre les deux souches.

Dans le but d'améliorer le suivi de fermentation des lipides produits par les levures oléagineuses, un protocole de suivi des lipides par cytométrie en flux a été développé. L'objectif étant de faciliter la prise de décision quant à une intervention durant la fermentation. Ce protocole permet de suivre la croissance des levures, leurs états physiologiques et leurs contenus lipidiques. Ces renseignements obtenus avec un délai très court, en comparaison des méthodes analytiques traditionnelles de type chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme, permettent d'économiser du temps. Ils aideront également à la formulation du milieu pour améliorer le rendement de production des lipides. Un ajout de source carbonée tel que du glycérol (sous-produit de la transestérification des triglycérides microalgues) est envisagé.

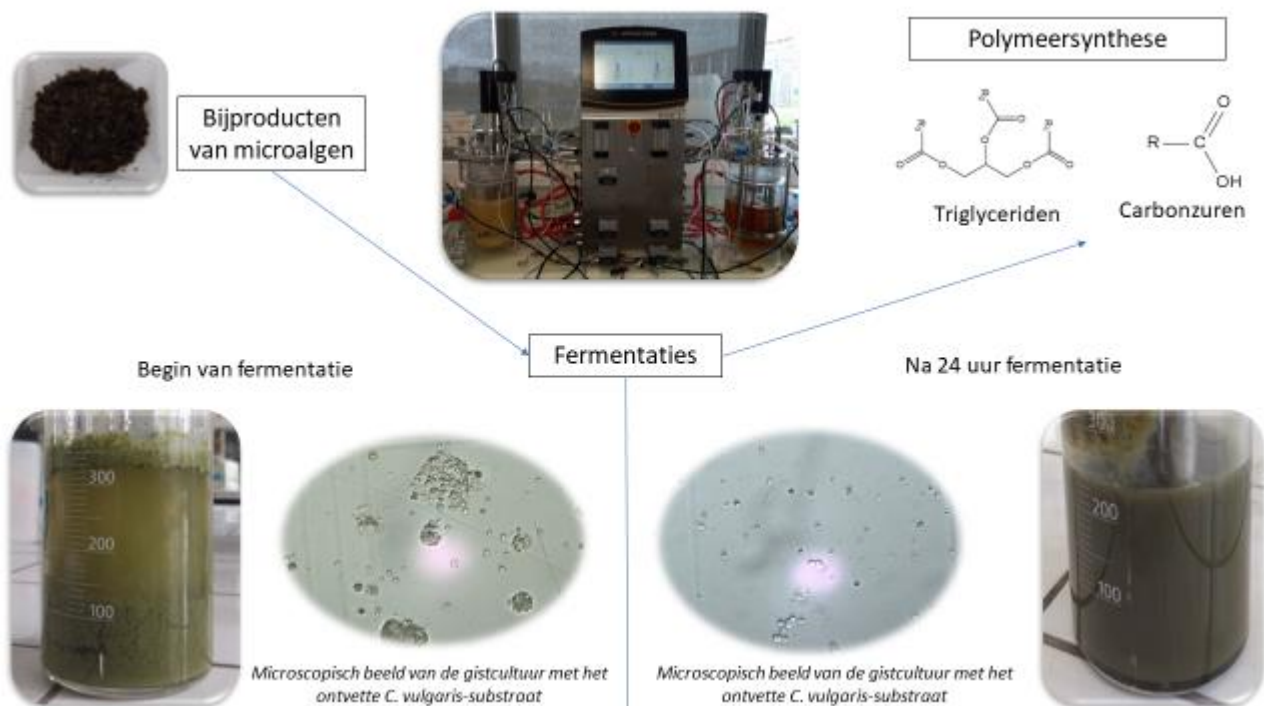
La preuve de concept d'une fermentation d'un tel résidu est possible. Le milieu n'étant pas suffisamment riche en carbone. Il n'est pas envisageable de s'en servir pour accumuler des triglycérides à moins de la compléter d'une source de carbone. Toutefois, l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés dérivant de la souche *Yarrowia lipolytica* testée permet d'envisager la production d'un large panel de molécules, entre autres des « building blocks » pour la synthèse de polymères tels que l'acide succinique, acide citrique, ...

Adrio, J.L., 2017. Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1915–1920. <https://doi.org/10.1002/bit.26337>

Lopes, M., Gomes, A.S., Silva, C.M., Belo, I., 2017. Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.007>

Ontwikkeling van bijproducten uit microalgen door fermentatie

Microalgen hebben veel voordelen. Een van de grootste is de opname van atmosferische CO₂ en omzetting in biomassa en interessante moleculen. De moleculen van belang variëren, afhankelijk van de soort microalgen in kwestie. Ze kunnen worden gebruikt in de nutraceutische, farmaceutische, energie- en chemische synthesevelden. In het kader van het ALPO-project zijn twee soorten geselecteerd: *Chlorella vulgaris* die de capaciteit heeft om vetzuren op te slaan en *Arthrospira platensis* die polysacchariden ophoopt.



Figuur 1: Diagram dat de transformatie van bijproducten van microalgen in glycerolipiden en carbonzuren voor de synthese van polymeren weergeeft

Deze fracties zijn onderwerp van onderzoek binnen het ALPO-project en zullen gevaloriseerd worden in de vorm van synthons voor de productie van biogebaseerde polymeren (Nieuwsbrief 2). Verbindingen die niet betrokken zijn bij de synthese van polymeren worden gevaloriseerd via fermentatie. Het doel is om de milieu-impact en de kosten van het proces te verminderen. Gezien het vochtgehalte van de biomassa, lijkt fermentatie in een vloeibaar medium de meest interessante oplossing. Daarnaast is het mogelijk om via fermentatie, moleculen met een hoge toegevoegde waarde te produceren en kostbare stappen (energetisch en economisch) te vermijden om water uit het microalgensubstraat te verdampen.

Om in te spelen op de problemen die het substraat oplegt, is ervoor gekozen om te werken met oliehoudende gisten. *Yarrowia lipolytica* heeft een veelbelovende toekomst in bioraffinaderijen. Dit rechtvaardigt gedeeltelijk zijn keuze in het project (Adrio, 2017; Lopes et al., 2017). Deze soort maakt het mogelijk om de door microalgen geproduceerde vetzuren kwalitatief en kwantitatief aan te vullen. Bovendien is deze gist in staat om een grote verscheidenheid aan substraten te metaboliseren, variërend

van suikers tot koolwaterstoffen, wat flexibiliteit mogelijk maakt bij de keuze van de techniek die wordt gebruikt om de verbindingen uit microalgen te extraheren.

De residuen van de extractie van lipiden van *C. vulgaris* werden onderworpen aan fermentatietesten (figuur 1). Deze residuen als voedingsbodem maakten het mogelijk om een groei van *Y. lipolytica* te markeren. Er is ook aangetoond dat er geen significante verandering is in de groeiparameters van de gist in vergelijking met het referentiesubstraat. Er werd ook een betere dispersie van het substraat tijdens fermentatie opgemerkt, evenals een afname in grootte van de aggregaten van *C. vulgaris* (Fig 1). De op dit substraat aangelaakte lipiden met behulp van de gist, zijn vanuit kwalitatief oogpunt interessant. Nader onderzoek is gaande om het exacte vetgehalte te bepalen. Aangezien de productie van lipiden door de geteste gist-stam niet afdoende was, werd een genetisch gemodificeerde stam, afgeleid van de eerste stam, getest. De opbrengst aan lipideproductie was verbeterd zonder variatie van het lipidenprofiel tussen de twee stammen.

Om de monitoring van fermentatie van lipiden geproduceerd door oliehoudende gisten te verbeteren, is een protocol ontwikkeld voor het monitoren van lipiden door flowcytometrie. Het doel is om de besluitvorming over een interventie tijdens fermentatie te vergemakkelijken. Dit protocol maakt het mogelijk om de groei van gisten, hun fysiologische toestanden en hun vetgehalte op te volgen. Het verkrijgen van deze informatie gaat vlotter in vergelijking met traditionele analytische methoden zoals gaschromatografie in combinatie met een vlamionisatiedetector, wat tijd bespaart. Dit zal ook helpen bij de samenstelling het medium om de productieopbrengst van lipiden te verbeteren. Een toevoeging van koolstofbron zoals glycerol (bijproduct van transverestering van microalgale triglyceriden) wordt overwogen.

Een proof of concept van fermentatie van een dergelijk residu is mogelijk. Het medium is niet rijk aan koolstof. Het is niet mogelijk om triglyceriden te verzamelen, tenzij door aanvulling met een koolstofbron. Het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen die zijn afgeleid van de geteste *Yarrowia lipolytica*-stam maakt het echter de productie van een groot aantal moleculen mogelijk, onder meer "bouwstenen" voor de synthese van polymeren zoals barnsteenzuur, citroenzuur, ...

Adrio, J.L., 2017. Oleaginous yeasts: Promising platforms for the production of oleochemicals and biofuels. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 1915–1920. <https://doi.org/10.1002/bit.26337>

Lopes, M., Gomes, A.S., Silva, C.M., Belo, I., 2017. Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.11.007>

Chef de file
Projectleider



Opérateurs
Partners



Opérateurs associés
Geassocieerde partners



Cofinanceurs
Medefinanciers

