

Appel A Projets IV : formulaire de candidature

Il n'est pas indispensable d'utiliser le présent formulaire pour soumettre un projet. Toutefois pour faciliter le travail des rapporteurs, merci de respecter l'architecture générale de ce document pour votre réponse.

Nom du correspondant : Philippe MOULIN

Nom du projet : Analyse du stress des microalgues

Résumé du projet (5 lignes en anglais) :

The aim of this work is to carry out a global study from the rheological properties of microalgae suspensions to a microfiltration membrane process. The aim is to determine under which operating conditions the microalgae could break. The integrity of these microalgae suspensions is evaluated as a function of the operating conditions using X ray tomography, TEM and MEB. The complementary aspect of these techniques should allow the determination of average but also individualized information about microalgae.

Volet(s) complémentaires demandé(s) : Collaboration internationale Pédagogie

Contenu scientifique (3 pages maxi)

I. Contexte scientifique

Les microalgues sont des micro-organismes photosynthétiques qui constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire en milieu aquatique et qui se développent à partir de CO₂ et d'énergie lumineuse. Grâce à leur contenu cellulaire composé de protéines, de lipides, de glucides, de pigments et d'autres molécules d'intérêts, les microalgues offrent des solutions en réponse aux enjeux actuels de transition environnementale, alimentaire et énergétique. Ainsi, elles peuvent être utilisées pour diverses applications (santé, alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, traitement de l'eau, biomatériaux et énergie). Aujourd'hui, à peine une vingtaine d'espèces sont utilisées à des fins commerciales et en France seulement 4 espèces sont certifiées pour une utilisation alimentaire (la Spiruline depuis 1981, *Odontella aurita* depuis 2002, la Chlorelle depuis 2004 et *Tetraselmis chuii* depuis 2014). Dans le cadre de la concentration de produits d'intérêt pour ces différents domaines industriels, l'optimisation de la production de microalgues et l'extraction de métabolites d'intérêt apparaissent clairement comme des voies en devenir du fait de la diversité des microalgues et des métabolites présents **et c'est dans ce cadre que se positionne ce sujet de recherche.** Le projet de recherche va porter sur la culture de microalgues pour des applications en cosmétiques et pharmaceutiques.

II. Programme

II.1. Concentration de microalgues par procédés membranaires

Les microalgues sont des particules « solides » en suspension dans leur milieu de culture et des procédés de séparation solide/liquide sont utilisés pour les récolter. La centrifugation apparaît comme un procédé fiable, peu coûteux et nécessitant très peu d'entretien pour la récolte de microalgues. Cependant, les performances de ces procédés sont fortement liées à l'espèce cultivée (grande biodiversité des souches), à la taille de la microalgues et à la concentration en suspension (0.1 à 10 g.L⁻¹) dépendant des systèmes de production. Aussi, une étape de pré-concentration de la biomasse (décantations/concentrations successives) doit généralement être appliquées dans la profession pour optimiser ce procédé en particulier pour les petites microalgues qui ne peuvent être directement centrifugées. Cela consiste, chez les industriels, à induire la floculation des sels (entraînant les cellules de microalgues) par modification des paramètres du milieu (pH) grâce à l'ajout de réactifs chimiques. L'utilisation de ces produits chimiques, peut avoir un impact délétère sur l'environnement et sur la qualité de la biomasse produite. De plus, le coût des produits chimiques augmente et pénalise économiquement la production de ces microalgues. Etant donné la taille des composés ciblés et les facteurs de concentration souhaités, la perméabilité de la membrane diminuerait drastiquement pour devenir quasi nulle lors de la filtration de cette matrice et l'utilisation d'un procédé membranaire pour cette application n'a ainsi jusqu'ici pas été envisagée. La mise sur le marché de membranes en carbure de silicium présentant de très faibles tortuosités change la donne et ouvre des perspectives intéressantes. Des expériences de concentration par microfiltration pour étudier le colmatage seront réalisées en fonction du temps, des facteurs de concentration et des débits de circulation avec des membranes industrielles. Les pertes de matière, les facteurs de concentration en matières sèches accessibles et la qualité du concentrat de microalgues seront les critères de faisabilité. La gestion du procédé prenant en compte le flux de filtration, l'utilisation de backpulses ou de backflush pour maintenir les flux et/ou récupérer les microalgues seront ainsi étudiés. Différentes espèces de microalgues seront étudiées comme *Odontella aurita* ou *Phaeodactylum tricoratum*. Dans le cadre d'un projet respectueux de l'environnement mais également d'optimisation de procédés de production, des cultures de microalgues seront réalisées avec le perméat obtenu lors des étapes de concentrations dans un objectif de réutilisation des eaux mais

également pour réinjecter les nutriments non consommés. **Une étude préliminaire réalisée en interne au M2P2 a permis de montrer la faisabilité de cette approche**

Aspect innovant : La concentration de microalgues par membrane en carbure de silicium n'a jamais été envisagée et apparaît pour cette étape une innovation très importante à la vue des facteurs de concentrations souhaités. Le projet s'inscrit dans une volonté de développement durable avec la réutilisation des eaux limitant le prélèvement à la source mais aussi avec la volonté de recycler les nutriments résiduels nécessaires à la croissance des algues.

II.2. Cisaillement des microalgues

Au-delà des questions liées à la perméabilité et de la faisabilité globale d'un procédé de concentration de microalgues, un autre verrou scientifique et technique a été identifié : les contraintes de cisaillement dans la pompe et dans la membrane pourraient endommager les microalgues. Cette étude spécifique concerne l'impact de la contrainte de cisaillement sur la structure des objets micrométriques avec deux objectifs : (i) dans le cas de la concentration des microalgues et de leur remise en culture à partir du concentrat et/ou du perméat, cette contrainte devra être suffisamment faible pour ne pas endommager la structure des microalgues (partie ci-dessus) et (ii) elle devra être assez forte, une fois la concentration ciblée atteinte, pour casser ces structures et libérer ainsi les métabolites et autres composés d'intérêt. L'étude rhéologique des microalgues portera donc sur une plage de concentration attendue à minima lors des phases de concentration par membrane à savoir de C_0 à au moins $10 C_0$. La plage de contraintes de cisaillement sera celle donnée par les pompes à faibles contraintes d'une part et les débits de circulation maximum dans les membranes d'autre part. Le temps sera également un facteur important à prendre en compte pour savoir si, soumis à une contrainte de cisaillement durant l'étape de filtration, la structure de microalgues reste intègre ou pas. S'il y a libération des métabolites, la rhéologie du fluide change et la viscosité du produit augmente impactant forcément le procédé de filtration membranaire. L'apport de cette étude rhéologique sera alors important pour (i) mieux appréhender cette augmentation de viscosité dans la conduite du procédé de filtration, (ii) prévoir la réutilisation des concentrats et/ou des perméat pour une remise en culture et (iii) prévoir le relargage des métabolites et composés d'intérêt.

Aspect innovant : Etude de la structure de microalgues sous contrainte de cisaillement contrôlée et apport de ces résultats sur la concentration par membrane.

II.3. Validation de l'intégrité

Pour valider l'effet du cisaillement sur les microalgues, l'intégrité des microalgues sera étudiée par différentes approches : (i) fluorescence : la spectroscopie de fluorescence 2D est une technique sensible pour le suivi des systèmes biologiques et permet de suivre la viabilité des microalgues, (ii) TEM et MEB. Le MEB Jeol 7900F du CINaM permet de travailler à très basse tension (inférieur à 1kv) tout en gardant une résolution optimale (< 1 nm). Ce travail à très basse tension permet premièrement de travailler sur des échantillons isolants sans nécessiter une métallisation de conduction (susceptible de masquer des détails de surface) mais surtout de faire ressortir l'extrême surface des échantillons : moins de pénétration dans le matériau grâce à la faible tension d'accélération du faisceau). Si toutefois le travail à très basse tension devait être insuffisant pour imager l'échantillon, le microscope est équipé d'un mode "low vaccum" qui permet de travailler sur des échantillons très fragiles et/ou hydratés en modifiant la pression à l'intérieur de la chambre du microscope (10 à 300 Pa). Ces modes de travail, ainsi que la possibilité de fixation des microalgues (formaldéhyde), devraient permettre d'imager les échantillons. Le TEM et la préparation des échantillons associés devraient permettre d'imager l'intérieur des microalgues pour voir s'il y a des modifications sur les aspects métabolites. **Il est à noter que ce travail a déjà été réalisé sur des virus en partenariat entre les deux laboratoires** (iii) la microtomographie à rayons X doit permettre d'accéder à

des paramètres globaux à l'échelle de la population, tout en déterminant les caractéristiques de chaque cellule (volume cellulaire, surface cellulaire, sphéricité...). L'intérêt du dispositif de tomographie réside également dans le fait qu'il sera possible de réaliser des acquisitions volumiques à l'échelle du dispositif expérimental sans manipulation des populations de microalgues. Des techniques de traitement d'images spécifiques devront être développées pour individualiser les microalgues et ainsi accéder à leurs descripteurs morphologiques. L'indice d'absorption des rayons X étant lié à la composition chimique des cellules, notamment à leur masse sèche, la tomographie devrait également permettre le suivi de l'évolution des composants des microalgues après cisaillement. L'holotomographie peut être appliquée sur tout échantillon semi-transparent d'épaisseur inférieure à 40 μm (micro-organismes de type microalgues). L'enregistrement de séries temporelles est possible. (iv) Mise en culture : une remise en culture utilisant les perméats de filtration membranaire et les microalgues cisailées permettra de confirmer la viabilité des techniques analytiques précédemment citées.

III. Retombées attendues

Les retombées attendues sont nombreuses : (i) l'écriture de publications sur la concentration des microalgues par membranes, sur l'étude rhéologique des suspensions de microalgues sous cisaillement contrôlés, (ii) la comparaison des différentes techniques analytiques, (iii) de nouveaux partenariats et des réponses à des appels à projet. Les résultats, s'ils s'avèrent positifs, pourraient être étendus à l'échelle de quelques m^3 pour montrer la faisabilité industrielle chez le partenaire Innovalg.

IV. Références

- Castro-Muñoz, Roberto, et Octavio García-Depraect. « Membrane-Based Harvesting Processes for Microalgae and Their Valuable-Related Molecules: A Review ». *Membranes* 11, no 8 (août 2021): 585. <https://doi.org/10.3390/membranes11080585>.
- Eray, Esra, Victor M. Candelario, Vittorio Boffa, Hamed Safafar, David N. Østedgaard-Munck, Nanette Zahrtmann, Haris Kadrispahic, et Mads K. Jørgensen. « A Roadmap for the Development and Applications of Silicon Carbide Membranes for Liquid Filtration: Recent Advancements, Challenges, and Perspectives ». *Chemical Engineering Journal* 414 (15 juin 2021): 128826. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.128826>.
- Frappart, Matthieu, Anthony Massé, Michel Y. Jaffrin, Jérémy Pruvost, et Pascal Jaouen. « Influence of Hydrodynamics in Tangential and Dynamic Ultrafiltration Systems for Microalgae Separation ». *Desalination* 265, no 1 (15 janvier 2011): 279 83. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.07.061>.
- Galinha, C.F., G. Carvalho, C.A.M. Portugal, G. Guglielmi, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, Two-dimensional fluorescence as a fingerprinting tool for monitoring wastewater treatment systems, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86 (2011) 985–992. <https://doi.org/10.1002/jctb.2613>.
- Gómez-Loredo, Alma, José González-Valdez, Mirna González-González, Jorge Benavides, et Marco Rito-Palomares. « Practical Experiences from the Bench-Scale Implementation of a Bioprocess for Fucoxanthin Production ». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 93, no 7 (2018): 2033 39. <https://doi.org/10.1002/jctb.5494>.
- Hwang, Taewoon, Madhusudhana Rao Kotte, Jong-In Han, You-Kwan Oh, et Mamadou S. Diallo. « Microalgae Recovery by Ultrafiltration Using Novel Fouling-Resistant PVDF Membranes with in Situ PEGylated Polyethyleneimine Particles ». *Water Research* 73 (15 avril 2015): 181 92. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.002>.
- Li, Haifeng, Zhangwei Li, Siqin Xiong, Hanrui Zhang, Na Li, Shuanghui Zhou, Yongmei Liu, et Zebo Huang. « Pilot-Scale Isolation of Bioactive Extracellular Polymeric Substances from Cell-Free Media of Mass Microalgal Cultures Using Tangential-Flow Ultrafiltration ». *Process Biochemistry* 46, no 5 (1 mai 2011): 1104 9. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.028>.
- Lina, Robin, Olivier Lepine, Pascal Jaouen, et Anthony Masse. « Recovery of Water-Soluble Compounds from *Tisochrysis Lutea* ». *Membranes* 12, no 8 (août 2022): 766. <https://doi.org/10.3390/membranes12080766>.
- Ljubic, Anita, Hamed Safafar, Susan L. Holdt, et Charlotte Jacobsen. « Biomass Composition of *Arthrospira Platensis* during Cultivation on Industrial Process Water and Harvesting ». *Journal of Applied Phycology* 30, no 2 (1 avril 2018): 943 54. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1332-y>.
- Monte, Joana, Marta Sá, Cláudia F. Galinha, Luís Costa, Herre Hoekstra, Carla Brazinha, et João G. Crespo. « Harvesting of *Dunaliella Salina* by Membrane Filtration at Pilot Scale ». *Separation and Purification Technology* 190 (8 janvier 2018): 252 60. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.08.019>.
- Morineau-Thomas, O., P. Jaouen, et P. Legentilhomme. « The Role of Exopolysaccharides in Fouling Phenomenon during Ultrafiltration of Microalgae (*Chlorella Sp.* and *Porphyridium Purpureum*): Advantage of a Swirling Decaying Flow ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 25, no 1 (1 avril 2002): 35 42. <https://doi.org/10.1007/s00449-001-0278-1>.
- Ortiz Tena, Franziska, Karolína Ranglová, David Kubač, Christian Steinweg, Claudia Thomson, Jiří Masojidek, et Clemens Posten. « Characterization of an Aerated Submerged Hollow Fiber Ultrafiltration Device for Efficient Microalgae Harvesting ». *Engineering in Life Sciences* 21, no 10 (2021): 607 22. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100052>.
- Pavez, Javier, Francisco Cabrera, Laura Azócar, Alvaro Torres, et David Jeison. « Ultrafiltration of Non-Axenic Microalgae Cultures: Energetic Requirements and Filtration Performance ». *Algal Research* 10 (1 juillet 2015): 121 27. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.022>.
- Rossignol, N., L. Vandanjon, P. Jaouen, et F. Quéméneur. « Membrane Technology for the Continuous Separation Microalgae/Culture Medium: Compared Performances of Cross-Flow Microfiltration and Ultrafiltration ». *Aquacultural Engineering* 20, no 3 (1 août 1999): 191 208. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00018-7).
- Safi, Carl, Dylan Z. Liu, Benjamin H. J. Yap, Gregory J. O. Martin, Carlos Vaca-Garcia, et Pierre-Yves Pontalier. « A Two-Stage Ultrafiltration Process for Separating Multiple Components of *Tetraselmis Suecica* after Cell Disruption ». *Journal of Applied Phycology* 26, no 6 (1 décembre 2014): 2379 87. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0271-0>.