

# Production de molécules à haute valeur ajoutée en photobioréacteurs (PBR) à l'aide de microalgues encapsulées dans un matériau hybride (projet VALOALGUE\*)

Robin RONNEAU<sup>1a</sup>, Bao Lian SU<sup>2</sup>, Li WANG<sup>2</sup>, Stéphanie GERIN<sup>3</sup>, Sébastien CALVO<sup>3</sup>, Klara WECK<sup>3</sup>, Anne-Lise HANTSON<sup>1</sup>, Diane THOMAS<sup>1</sup>  
1 – Département de Génie des Procédés Chimiques et Biochimiques, UMONS, Belgique ; 2 – Département de Chimie, UNAMUR, Belgique ; 3 – Département de Génie Chimique, ULiège, Belgique  
a – robin.ronneau@umons.ac.be

\* VALOALGUE fait partie du portefeuille de projets "Algae Factory", financé par le FEDER

## CONTEXTE

Actuellement, les **microalgues** font l'objet de nombreuses recherches en raison de leur capacité à produire des métabolites valorisables comme des lipides ou des saccharides. Ce type de **culture de masse** permet notamment la production de molécules biosourcées technologiquement intéressantes (bioéthanol, biodiesel, biopolymères,...)  
D'un autre côté, le marché des **molécules bioactives** comme les protéines recombinantes est en pleine expansion dans le monde. A l'instar d'autres organismes vivants, les microalgues peuvent produire, en petite quantité, des métabolites à très haute valeur ajoutée, mais avec l'avantage que ces dernières sont capables de vivre de manière autotrophe. Ces métabolites sont produits et excrétés dans le milieu de culture, soit naturellement, soit résultant d'une transformation génétique. Un des challenges est la **récupération des molécules produites** en culture libre. Des étapes de centrifugation et/ou filtration étant généralement coûteuses en énergie et en temps, et présentant des risques de colmatage, l'**immobilisation des microalgues dans un matériau poreux** devrait représenter une bonne alternative pour récupérer les métabolites dans un milieu de culture, directement compatible avec des techniques de purification.

## OBJECTIFS

Les deux objectifs principaux de ce projet sont d'une part la **sélection d'une souche microalgale** produisant des molécules bioactives intéressantes, et d'une autre part le développement d'un matériau poreux pour l'encapsulation des cellules. Ce matériau se doit d'être biocompatible, de pouvoir contenir les microalgues, permettre la diffusion des nutriments, des métabolites excrétés et de la lumière, et enfin de résister mécaniquement durant une durée de culture adéquate.

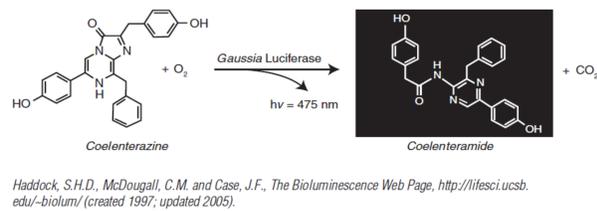
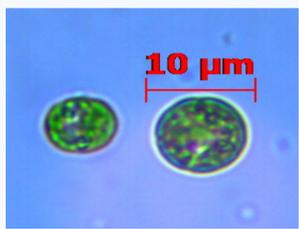
Ensuite, l'**optimisation du procédé** (design et influence de nombreux paramètres) représente également une grande part de la recherche. Il existe en effet, de nombreux designs possibles de photobioréacteurs (plat, colonne, tubulaire,...) ainsi que différents moyens de les agiter (airlift, lit fluidisé, colonne à bulles, agitation magnétique,...). De plus, de nombreux paramètres influencent le procédé : milieu de culture, forme et taille des supports, ratio matière d'encapsulation/milieu de culture, illumination,...

## SOUCHE ET MÉTABOLITE

La souche principalement étudiée pour ce projet est *Chlamydomonas reinhardtii*, dépourvue de paroi cellulaire et modifiée génétiquement pour produire et excréter de la *Gaussia luciférase*, une protéine recombinante bioluminescente en présence de son substrat. Cette microalgue est une souche d'eau douce, capable de vivre sous conditions autotrophiques (milieu TMP) ou mixotrophiques (milieu TAP) :

*Chlamydomonas reinhardtii* mutant

Réaction de bioluminescence de la *Gaussia luciférase*



Haddock, S.H.D., McDougall, C.M. and Case, J.F., The Bioluminescence Web Page, <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/> (created 1997; updated 2005).

## MATÉRIAU POREUX

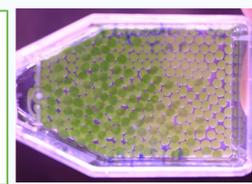
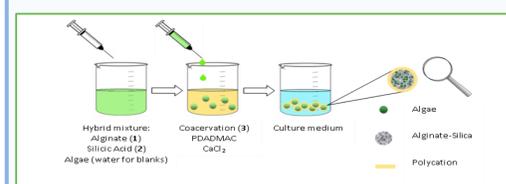
En collaboration avec l'UNAMUR, le matériau poreux étudié actuellement est essentiellement composé d'alginate, auquel il est possible d'ajouter une composante inorganique afin de consolider la structure et la durée de vie du matériau. Différentes formulations ont été envisagées:

Composition du mélange à coacerver:

- Différents types d'alginate
- Ajout de silicate de sodium
- Ajout de Tibaldh (Titanium(IV) bis(ammonium lactato) dihydroxyde)

Composition de la solution de coacervation:

- CaCl<sub>2</sub> avec possibilité d'ajout d'un polycation: → Polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC)



- Diffusion des métabolites, nutriments et lumière
- Biocompatibilité

## MÉTABOLITE D'INTÉRÊT

Pour la récupération de la *Gaussia luciférase*, deux méthodes sont développées:

### Étape de PURIFICATION :

→ La *Gaussia luciférase* étant taguée par un tag « Strep » (enchaînement de 6 acides aminés spécifiques), des essais de purification sur des colonnes StrepTagII ont été réalisés sans présenter de récupération de la protéine, la conformation 3D rendant peut-être le tag indisponible



Photo: www.gelifsciences.com

→ Utilisation de concentrateurs de protéines Vivaspin™. Il s'agit d'un système avec une membrane « cutoff » basée sur la masse moléculaire, présentant l'avantage d'être facilement applicable à plus grande échelle (scale-up) via les procédés de filtration tangentielle



Photo: www.gelifsciences.com



Photo: www.sartorius.es

Concentration ≠ Purification

→ Electrophorèse pour vérifier la présence d'autres protéines

### Étape de QUANTIFICATION:

→ Quantification de la bioluminescence de la *Gaussia luciférase* en présence de son substrat (coelenterazine) à l'aide d'un spectromètre multifonctions avec injecteurs automatiques (Synergy H1M de chez Biotek)

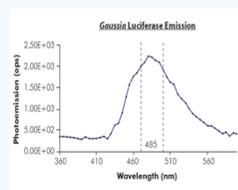
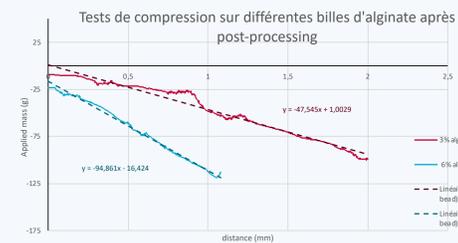


Photo: www.athenaes.com

## CARACTÉRISATION DU MATÉRIAU

Pour la caractérisation du matériau, des tests de compression sont réalisés permettant de comparer la résistance des billes.



Grâce aux données récoltées et à la formule ci-dessous, il est possible de déduire le Module de Young, caractérisant le matériau:

$$\alpha = \frac{(3\pi)^{2/3}}{2} P^{2/3} \left[ \frac{1 - \sigma^2}{\pi E} \right]^{2/3} \left( \frac{1}{D} \right)^{1/3}$$

Avec:  $\alpha$  : Déformation élastique [mm]  
 $P$  : Somme des forces appliquées à la sphère [N]  
 $\sigma$  : Coefficient de Poisson [-]  
 $E$  : Module de Young [N.mm<sup>-2</sup>]  
 $D$  : Diamètre de la sphère [mm]

5 mélanges alginate 4% - TibaldH possibles:	0 / 50 / 100 / 200 / 300 mM en TibaldH
5 solutions de coacervation (CaCl <sub>2</sub> 200mM - PDADMAC) possibles:	0 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 2 % w/w en PDADMAC

→ 25 formulations différentes à caractériser

- tests de compression
- tests de transmission de la lumière
- tests réels en colonne à lit fluidisé sans algues et avec algues



## DISCUSSION

Les premiers résultats sont encourageants: la souche sélectionnée par l'ULiège répond aux critères, en produisant et excréant un métabolite intéressant pour lequel une méthode de quantification robuste ainsi qu'une méthode de concentration ont été développées. Différentes formulations ont été étudiées par l'UNAMUR, et celle contenant de l'alginate et une certaine quantité de TibaldH, coacervée par une solution de CaCl<sub>2</sub> avec ajout d'un polycation (PDADMAC), a été retenue. La caractérisation du matériau est en cours dans le but de converger vers le meilleur compromis, à savoir, une bille robuste, permettant une diffusion des nutriments, de la lumière et des métabolites d'intérêt.

## RÉFÉRENCES

- Lauersen KJ, Berger H, Mussgnug JH, Kruse O. 2012. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.*
- Puttock M, Thwaite E. 1969. NSL Technical Paper No. 25: Elastic compression of spheres and cylinders at point and line contact. *Ind. Res.* <http://emtoolbox.nist.gov/Publications/NationalStandardsLaboratoryTechnicalPaperNo25.pdf>.
- Rathnayaka T, Tawa M, Sohya S, Yohda M, Kuroda Y. 2010. Biophysical characterization of highly active recombinant *Gaussia luciferase* expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1804**:1902–1907.
- Shao N, Bock R. 2008. T E C H N I C A L N O T E A codon-optimized luciferase from *Gaussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*:381–388.