



HAL
open science

Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant

Céline Dejoye

► **To cite this version:**

Céline Dejoye. Eco-extraction et analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Autre. Université d'Avignon, 2013. Français. NNT : 2013AVIG0251 . tel-01712195v2

HAL Id: tel-01712195

<https://theses.hal.science/tel-01712195v2>

Submitted on 19 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences
de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

SPECIALITE : CHIMIE

Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant

Par

Céline DEJOYE TANZI

Thèse soutenue le 12 Novembre 2013 devant un jury composé de :

ABERT VIAN	Maryline	Maître de Conférences HDR UMR 408 INRA – Université d'Avignon, France	<i>Directeur de thèse</i>
BADENS	Elisabeth	Professeur UMR CNRS 6181 – Université Paul Cézanne, France	<i>Présidente du jury</i>
CHEMAT	Farid	Professeur UMR 408 INRA – Université d'Avignon, France	<i>Directeur de thèse</i>
CULIOLI	Gérald	Maître de Conférences HDR Université du Sud Toulon – Var, France	<i>Rapporteur</i>
DE LA GUARDIA	Miguel	Professeur Université de Valencia, Espagne	<i>Examineur</i>
FERNANDEZ	Xavier	Professeur Université de Nice, France	<i>Rapporteur</i>
LASSERRE	Thomas	Responsable du pôle Bioénergies La Compagnie du Vent - GDF Suez, France	<i>Invité</i>

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier :

*Professeur Elisabeth Badens à l'Université Paul
Cézanne d'Aix en Provence*

Dr HDR Gérald Culioli à l'Université Sud Toulon-Var

*Professeur Miguel De La Guardia à l'Université de
Valencia en Espagne*

Professeur Xavier Fernandez à l'Université de Nice

Monsieur Thomas Lasserre

*Responsable du pôle Bioénergies au sein de la
Compagnie du Vent à Montpellier*

pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier la Compagnie du Vent pour le co-financement de ma thèse dans le cadre du projet Salinalgue.

Je remercie également Monsieur Thomas Lasserre et Monsieur Jean-Philippe Pete, Responsable du Pôle Bioénergies pour leur contribution active à tous les échanges et discussions.

Je voudrais également remercier l'ensemble des partenaires du projet Salinalgue pour les échanges tant techniques que conviviaux que j'ai pu avoir avec eux tout au long de ce travail.



Je remercie très sincèrement mon directeur de thèse, le Professeur Farid Chemat pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire GREEN. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour vos savoirs, la rigueur scientifique par laquelle j'ai été guidé ainsi que pour la qualité de vos conseils avisés. Merci d'avoir pu faire de cette expérience un projet, une discussion enrichissante et une aventure unique.

Je voudrais remercier tout spécialement ma directrice de thèse, le Docteur HDR Maryline Vian qui a toujours été présente durant cette thèse. Ça a été un honneur d'être sa doctorante pendant ces trois années, je n'aurais pas demandé un meilleur modèle. Son implication, son aide et son soutien permanent m'ont été crucial. Pour tout cela, je lui exprime mes plus profonds remerciements.

Je tiens à remercier très chaleureusement toute l'équipe GREEN: Mme Anne-Sylvie Fabiano-Tixier, Mme Sandrine Perino, Mme Njara Rakotomanomana, Mme Karine Ruiz, M. Emmanuel Petitcolas et M. Julien Matois pour leur présence et leur aide au quotidien. Je vous remercie d'avoir contribué à la réalisation de cette aventure.

J'adresse également mes remerciements à tous les doctorants et stagiaires m'ayant accompagnés au cours de cette thèse. Daniella Pingret plus qu'une collègue de travail, tu es une véritable amie, tu as toujours su être présente pour moi dans les bons comme dans les moments les plus durs. Merci d'avoir été

présente même après avoir changé de continent ! Tamara Allaf, merci pour ton soutien, et ton optimisme à toutes épreuves. Priscilla Veggi, Loïc Petigny, Ying Li, Aurore Filly, Sabiha Achat, Shiraz Bitar, Jean-Thomas Pierson, Dima Mnayer, Florence Merck, Olivier Rey, Doriane Ferreira, Magalie Jacotet Navarro, Cassandra Breil, Anne-Gaëlle Sicaire,... et bien d'autres que j'oublie sûrement et qui se reconnaîtrons une grand merci pour votre aide dans tous les moments de ma thèse. Votre amitié m'est précieuse et ça a été pour moi un plaisir de travailler à vos côtés.

Merci à ma belle-famille pour leur touchante inquiétude quant à l'avancée de mes travaux.

Je tiens à remercier ma famille, mes grands-parents, mon frère Vincent et en particulier mes parents pour leur amour, leur encouragement et leur soutien inconditionnellement dans mon parcours universitaire, comme dans la vie.

Je ne pouvais finir sans remercier mon Jérémie pour son amour et son soutien au quotidien. Ta joie de vivre, ton humour si particulier m'a toujours égayé dans les moments les plus durs. Ton optimisme a toujours été un moteur pour moi. Je n'aurai pu y parvenir sans toi.

Publications scientifiques

Articles :

- **Les micro-organismes comme sources de lipides pour les biocarburants de troisième génération.** Maryline Abert Vian, Céline Dejoye Tanzi, Farid Chemat. 2013. *OCL*, « *in press* »
- **New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process.** Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Farid Chemat. 2013. *Bioresource Technoogy*. 134, 271–275.
- **Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae.** Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Christian Ginies, Mohamed Elmaataoui, Farid Chemat. 2012. *Molecules* 17, 8196-8205.
- **Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* microalgae: microwave prior to supercritical carbon dioxide extraction.** Céline Dejoye, Maryline Abert Vian, Guy Lumia, Christian Bouscarle, Frédérique Charton, Farid Chemat. 2011. *Int J Mol Sci* 12, 9332-9341.

Communications orales et par affiches:

- **ISGC2 – International Symposium on Green Chemistry**, 21–24 Mai 2013, La Rochelle, France. *Green Extraction of oil from wet microalgae*. Céline Dejoye Tanzi, Daniella Pingret, Maryline Abert Vian, Farid Chemat.
- **GENP 2013 - Green Extraction of Natural Products**, 16-17 Avril 2013, Avignon, France. *Green Extraction of oil from wet microalgae*. Céline Dejoye Tanzi, Daniella Pingret, Maryline Abert Vian, Farid Chemat.
- **European Society of Sonochemistry ESS13**, 1-5 Juillet 2012, Lviv, Ukraine. *Ultrasound-assisted extraction of oil from microalgae using terpenes as an alternative to n-hexane*. Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Farid Chemat.
- **6^{ème} Journées Franco-Italiennes de Chimie**, 16–17 Avril 2012, Marseille, France. *Ultrasound assisted extraction of oil from microalgae using terpenes as an alternative to n-hexane*. Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Christian Ginies, Mohammed Elmaataoui, Farid Chemat.
- **Alg'n'chem**, 7–10 Novembre 2011, Montpellier, France. *Green Extraction of oil from microalgae using terpenes as alternative solvents from renewable feedstocks*. Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Christian Ginies, Mohammed Elmaataoui, Farid Chemat.
- **Adebiotech**, 17-19 Novembre 2010, Paris, France. *Green Extraction of oil from microalgae using terpenes as alternative solvents from renewable feedstocks*. Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Christian Ginies, Mohammed Elmaataoui, Farid Chemat.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	12
CHAPITRE I. LES MICRO-ALGUES, UN VIVIER DE RESSOURCES INEPUISABLES	17
I.1. DEFINITION ET ORIGINE DES MICRO-ALGUES	18
<i>I.1.1. Caractéristiques des micro-algues</i>	18
<i>I.1.2. Une diversité de familles et d'espèces</i>	19
I.2. COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES MICRO-ALGUES	24
I.3. CULTURE DES MICRO-ALGUES	26
<i>I.3.1. Culture en milieu ouvert ou raceway</i>	27
<i>I.3.2. Culture en milieu fermé ou photo-bioréacteur tubulaire (PBR)</i>	28
I.4. RECOLTE DES MICRO-ALGUES	30
<i>I.4.1. La centrifugation</i>	30
<i>I.4.2. La sédimentation</i>	30
<i>I.4.3. La filtration</i>	31
<i>I.4.4. La floculation</i>	31
<i>I.4.5. La flottation</i>	31
I.5. LES PROCEDES D'EXTRACTION DES LIPIDES POUR UNE APPLICATION BODIESEL	32
<i>I.5.1. L'extraction par solvant organique</i>	33
I.5.1.1. Principes de base	33
I.5.1.2. Paramètres de solubilité	34
I.5.1.3. Sélection de solvants organiques	36
I.5.1.4. Les agrosolvants	37
I.5.1.5. Techniques de déstructuration des cellules	38
<i>I.5.2. L'extraction par CO₂ supercritique</i>	42
<i>I.5.3. L'extraction par eau sub-critique</i>	44
I.6. APPLICATIONS ET MARCHES POTENTIELS DES MICRO-ALGUES	46
<i>I.6.1. Aquaculture</i>	47
<i>I.6.2. Agriculture</i>	48
<i>I.6.3. Production de biomasse à but alimentaire</i>	48
I.6.3.1. La Spiruline	48
I.6.3.2. La Chlorelle	49
<i>I.6.4. Production de molécules à haute valeur ajoutée</i>	50
I.6.4.1. Les pigments	50
I.6.4.2. Lipides et Acides gras polyinsaturés	52
I.6.4.3. Polysaccharides	53
I.6.4.4. Substances bioactives	54
<i>I.6.5. Applications environnementales</i>	54
I.6.5.1. Traitement des eaux usées	54
I.6.5.2. Remédiation du CO ₂	55
<i>I.6.6. Applications en bio-énergie</i>	55
I.6.6.1. Le biodiesel	55
I.6.6.2. Le bioéthanol	56
I.6.6.3. Le biohydrogène	57
I.6.6.4. Le biométhane	57
I.7. CONCLUSIONS ET PLAN D'ACTION	58
CHAPITRE II. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE	68
II.1. SOLVANTS ET REACTIFS	69
II.2. BIOMASSE MICRO-ALGALE	69
<i>II.2.1. Chlorella vulgaris</i>	69
<i>II.2.2. Nannochloropsis oculata</i>	70
<i>II.2.3. Dunaliella salina</i>	71
II.2.3.1. Souche issue de salins naturels	71
II.2.3.2. Souche du site de Gruissan	71
II.3. PROCEDES D'EXTRACTION DES LIPIDES DE MICRO-ALGUES	72
<i>II.3.1. Extraction conventionnelle selon Bligh and Dyer (lipides totaux)</i>	72
<i>II.3.2. Extraction par le n-hexane et solvants alternatifs</i>	72

II.3.3. <i>Extraction à partir de biomasse humide à l'aide de solvants alternatifs (Simultaneous Distillation and Extraction Process, SDEP)</i>	73
II.3.4. <i>Intensification du SDEP par micro-ondes (SDEP/MO)</i>	75
II.4. METHODES ANALYTIQUES	76
II.4.1. <i>Analyses physico-chimiques</i>	76
II.4.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche	76
II.4.1.2. Détermination de la teneur en matière organique et de la teneur en sels minéraux	76
II.4.2. <i>Analyse des extraits lipidiques</i>	77
II.4.2.1. Détermination de la composition en acides gras par CPG-FID	77
II.4.2.1. Analyse des classes de lipides par HPTLC	78
CHAPITRE III. LES SOLVANTS ALTERNATIFS POUR L'EXTRACTION DE LIPIDES DE MICRO-ALGUES SECHES	81
III.1. INTRODUCTION	82
III.1.1. <i>L'Extraction Solide-Liquide</i>	82
III.1.2. <i>Solvants organiques vs Solvants alternatifs</i>	83
III.1.3. <i>Les agrosolvants terpéniques</i>	84
III.2. LES TERPENES COMME SOLVANTS ALTERNATIFS POUR L'EXTRACTION DE LIPIDES DE MICRO-ALGUES	86
III.2.1. <i>Résumé de l'article</i>	86
III.2.2. <i>Article</i>	92
CHAPITRE IV. LES SOLVANTS ALTERNATIFS POUR L'EXTRACTION DE LIPIDES DE MICRO-ALGUES HUMIDES	107
IV.1. INTRODUCTION	108
IV.2. UNE NOUVELLE PROCEDURE POUR L'EXTRACTION DE LIPIDES A PARTIR DE BIOMASSE ALGALE HUMIDE	109
IV.2.1. <i>Résumé de l'article</i>	109
IV.2.2. <i>Article</i>	117
CHAPITRE V. INTENSIFICATION PAR LES MICRO-ONDES DE L'EXTRACTION DES LIPIDES A PARTIR DE BIOMASSE FRAICHE	131
V.1. LE CHAUFFAGE MICRO-ONDES VS CHAUFFAGE CONVENTIONNEL	132
V.1.1. <i>L'extraction assistée par micro-ondes</i>	135
V.1.2. <i>Description et fonctionnement du four à micro-ondes</i>	136
V.2. RESUME DE L'ARTICLE	137
V.3. ARTICLE	145
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	164
TABLES DES ILLUSTRATIONS	168
TABLE DES TABLEAUX	171
LISTE DES ABREVIATIONS	173

Introduction générale

Les fluctuations rapides de prix du pétrole et des ressources de base ainsi que les changements climatiques de plus en plus associés aux émissions de gaz à effet serre (GES) ont stimulé le développement de sources d'énergies alternatives et renouvelables comme la biomasse, le solaire et l'éolien. Les énergies fossiles constituent la principale source d'énergie de notre civilisation. Depuis plus d'un siècle, une de ces sources d'énergie, le pétrole, est devenu une base majeure de l'économie. Cette substance polyvalente de haute densité énergétique fournit à elle seule plus du tiers des besoins en énergie du monde. Au niveau mondial, 95 % des transports dépendent du pétrole et ce secteur névralgique consomme plus de 60 % de la production. Évaluer la disponibilité d'une ressource aussi stratégique que le pétrole est complexe mais les prédictions les plus pessimistes considèrent que le pic est déjà atteint. Les plus optimistes situent toutefois cette période pour peu après 2030. La prise de conscience de cette dangereuse dépendance énergétique au pétrole a fait réaliser l'urgence de préparer des solutions énergétiques alternatives et durables.

Les principales alternatives au pétrole pour les transports sont liées à l'électricité, aux gaz ou aux biocarburants. Ces derniers issus des produits de l'agriculture suscitent de grandes attentes, mais plusieurs facteurs les empêchent de répondre significativement aux besoins énergétiques du secteur stratégique des transports. Selon la demande actuelle, il serait impossible de subvenir aux besoins en carburants avec des sources agricoles sans provoquer d'importantes répercussions environnementales et sociales. Selon le National Research Council aux États-Unis (NRC), la production de biocarburants en Amérique du Nord et en Europe sera bientôt limitée par les besoins massifs et excessifs en terres agricoles. De plus, les rendements actuels des cultures conventionnelles ne permettent pas de produire assez de biocarburants pour remplacer significativement les carburants fossiles. Il faut noter que ces estimations sont basées sur des technologies et des niveaux de consommation en évolution. L'impact environnemental des biocarburants conventionnels n'est pas aussi positif qu'escompté. La surproduction agricole qui s'est développée a eu de sérieuses conséquences environnementales comme la déforestation, l'émission de GES, l'appauvrissement des aquifères et la pollution par les engrais et les pesticides. La production de biocarburants conventionnels provoque aussi de sérieux impacts sur le plan socio-économique parce que l'augmentation de la demande mondiale de produits agricoles utilisés pour générer des biocarburants a beaucoup fait augmenter le prix des

aliments. Les biocarburants ont causé d'autres problèmes tout en ne répondant qu'à une fraction de la demande massive de carburants dans le monde. Il est possible qu'une conversion graduelle des sources fossiles d'énergie vers des sources plus naturelles comme la biomasse micro-algale, qui représente une voie raisonnable compte tenu des enjeux globaux.

Depuis plusieurs années, de nombreuses espèces de micro-algues sont étudiées et testées dans le monde. Certaines présentent des rendements en biomasse prometteurs avec des teneurs particulièrement élevées en lipides. De plus, leurs rendements énergétiques à l'hectare sont plus de dix fois supérieures à ceux des meilleures cultures terrestres. La plus grande part du concept d'algo-carburants repose sur la reproduction en mode accéléré du processus photosynthétique opéré par les micro-algues dans les mers. Les technologies qui exploitent ce concept ne nécessitent donc pas d'irrigation, pas de grandes quantités d'eau potable, pas de pesticides ou d'immenses surfaces de terres cultivables. De plus, ces technologies peuvent être appliquées à l'épuration d'eaux usées et à la captation du CO₂ industriel issu de centrales au charbon ou d'autres procédés.

C'est sur cette idée qu'est né le projet SALINALGUE, porté par La Compagnie du Vent (34), filiale du Groupe GDF Suez, soutenu par le pôle de compétitivité TRIMATEC et qui a été retenu au Fond Unique Interministériel (FUI) lors du 9^{ème} appel à projets de recherche et développement. Le projet SALINALGUE vise la culture et la production d'une micro-algue native (*Dunaliella salina*) à très grande échelle en milieu ouvert sur des salines inexploitées et son bioraffinage afin de commercialiser différents bioproduits dont un biocarburant de nouvelle génération ayant de hautes performances en termes de rendement à l'hectare et de réduction d'émission de gaz à effet de serre.

Ce projet de culture de micro-algues présente de nombreux intérêts : la bioremédiation du CO₂ industriel (plus d'1 million de tonnes seront consommées par la photosynthèse des micro-algues), un contexte de production respectueux de l'environnement, le maintien d'activité sur les zones humides littorales que sont les salines tout en évitant des déséquilibres écologiques catastrophiques pour la faune et la flore locales, et une dynamique économique et sociale locale positive. Ce projet de plus de 7 millions d'euros d'investissement en R&D sur 48 mois regroupe de nombreux acteurs tels que l'IFREMER, le CEA, AIR LIQUIDE, GDF-SUEZ, des PME et plusieurs laboratoires publics comme le LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes

Biologiques et Procédés), le LM2P2 (Laboratoire de Modélisation en Mécanique et Procédés Propres), le LBE (Laboratoire des Biotechnologies de l'Environnement), l'INRIA COMORES et le GREEN (Groupe de Recherche en Eco-Extraction de produits Naturels) de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Chacun apporte une expertise sur des verrous bien ciblés du projet, à savoir: la connaissance sur les micro-algues, des technologies d'extraction et de fractionnement de lipides, le traitement et l'injection de CO₂ industriel, le montage de projet innovant de biocarburant, l'aquaculture, la méthanisation, l'étude environnementale de zones humides camarguaise, etc.

La partie R&D du projet SALINALGUE intègre une tâche importante de bioraffinage pour laquelle l'équipe GREEN est l'acteur principal dont l'objectif consiste à mettre au point et de développer une technique d'extraction dite « verte » d'huile algale pour la production de biocarburant de nouvelle génération. C'est dans ce contexte que s'intègre mon travail de thèse, ce manuscrit sera décliné en cinq chapitres.

Le chapitre I présentera une étude bibliographique des micro-algues : les espèces, les différents modes de culture et de récolte, l'extraction des lipides pour une application biodiesel. Une analyse critique de la littérature permettra de relever les inconvénients des procédés d'extraction existants afin de proposer des solutions alternatives appropriées.

Le chapitre II s'attachera à décrire la méthodologie expérimentale adoptée au cours de ce travail, en présentant les différentes souches de micro-algues étudiées, les analyses physico-chimiques, les différents procédés d'extraction des lipides ainsi que les méthodes d'analyses mises en place pendant ce travail de thèse.

Le chapitre III exposera les résultats portant sur l'extraction des lipides à partir d'une biomasse sèche en substituant le *n-hexane* par des solvants alternatifs. Les analyses qualitatives et quantitatives des extraits lipidiques seront également présentées.

Le chapitre IV sera axé sur l'extraction des lipides à partir de biomasse humide à l'aide d'une technique innovante permettant l'extraction des lipides marins sur une biomasse à plus de 80% d'humidité en présence de solvants alternatifs. La capacité de ces

derniers à extraire les lipides y sera détaillée par le biais des paramètres de solubilité d'Hansen.

Le chapitre V présentera l'intensification de la technique d'extraction sur biomasse humide grâce à l'utilisation des micro-ondes. Les conditions optimales permettront ainsi d'obtenir des extraits riches en lipides en un minimum de temps d'extraction.

Enfin les conclusions essentielles sur l'ensemble de ce travail ainsi que les perspectives de sa continuité seront dégagées.

Chapitre I. Les micro-algues, un vivier de ressources inépuisables

[Ⓢ] Maryline Abert Vian, Céline Dejoye Tanzi, Farid Chemat
« Les micro-organismes comme sources de lipides pour les biocarburants de troisième génération »
2013, *OCL (Oléagineux, Corps gras, Lipides)*, « in press »

Le premier chapitre de ce mémoire présente une introduction aux micro-algues au travers d'une étude bibliographique. Cet état de l'art traite des espèces, des différents modes de culture, de récolte, d'extraction ainsi que les différents champs d'applications de ces micro-organismes. Un accent sera mis sur les procédés d'extractions des lipides de micro-algues pour une application en biocarburant. Une analyse critique de la littérature permettra de relever les inconvénients et avantages des procédés d'extraction existants afin de proposer des solutions alternatives appropriées.

I.1. Définition et Origine des micro-algues

Les micro-algues sont des organismes microscopiques unicellulaires photosynthétiques qui se développent dans les milieux fortement aqueux et sont capables de convertir l'énergie lumineuse et une source de carbone (CO₂) en un ensemble de produits organiques. On utilise le terme «micro» car la taille d'une micro-algue varie de quelques micromètres à une centaine de micromètres.

L'existence des micro-algues et plus précisément des cyanobactéries remontent à plus de trois milliards d'années. En utilisant l'énergie solaire, elles produisirent de l'oxygène qui s'accumula lentement dans l'atmosphère primitive, atmosphère hostile riche en gaz carbonique et en méthane. L'enrichissement en oxygène de l'atmosphère primitive conduisit à la création de la couche d'ozone, qui protège la Terre des rayonnements solaires ultraviolets, et provoqua des modifications du climat et de la composition de la croûte terrestre. Ces changements ont ainsi permis une colonisation des continents par de nouvelles formes de vie animale et végétale.

I.1.1. Caractéristiques des micro-algues

La majorité des micro-algues sont dites photo-autotrophes ou autotrophes. Elles tirent leur énergie de la lumière par photosynthèse et leur principale source nutritive est le CO₂ en solution dans l'eau. Leur relative simplicité et la petitesse de leur taille permettent d'effectuer une photosynthèse très efficace. Elles convertissent ainsi l'énergie lumineuse en lipides et en hydrates de carbone, des formes plus condensées et stables d'énergie. Comme chez les végétaux terrestres, certaines espèces de micro-algues peuvent accumuler, dans certaines conditions de culture, le carbone fixé, sous forme de lipides appelés triglycérides. Les lipides stockés constituent alors une réserve

de carbone pour la micro-algue. En conditions normales, ces teneurs restent faibles, et les lipides sont principalement constitués de phospholipides et de glycolipides (constituants des membranes). Cependant, certaines espèces sont capables d'accumuler jusqu'à 80 % de leur poids sec en lipides (Chisti, 2007). Le stockage de lipides résulte d'un déséquilibre transitoire entre le flux de carbone issu de la photosynthèse et le flux d'autres éléments nécessaires à la croissance (phosphore ou azote). La cellule, qui est carencée en l'un de ces éléments, n'interrompt pas immédiatement l'acquisition du CO₂ nécessaire à la photosynthèse, mais ne peut pas l'utiliser pour construire des protéines puisque, par exemple, l'azote est manquant. Elle doit donc stocker ce flux, et chez certaines espèces, ce stockage a lieu principalement sous forme de lipides.

Cependant, certaines espèces de micro-algues sont capables de se développer en absence de lumière ; elles sont dites hétérotrophes. Dans ce cas elles se développent en mode fermé dans des bioréacteurs semblables à des fermenteurs et se nourrissent d'une source de carbone organique (Perez-Garcia et al., 2011).

I.1.2. Une diversité de familles et d'espèces

Les micro-algues sont très diversifiées et environ 30 000 espèces ont déjà été caractérisées. Ce nombre représente moins de 10 % du total existant estimé. En 2000, près d'une cinquantaine seulement ont été étudiées en détails (Michel Cavalla, 2000) et une dizaine d'espèces seulement sont exploitées au niveau industriel et commercial. Les scientifiques ont analysé les micro-algues pour les distinguer et les diviser en plusieurs classes selon des critères généraux comme la pigmentation, la structure biologique et le métabolisme.

Ces micro-organismes constituent un groupe très diversifié, dans lequel nous retrouvons des espèces procaryotes (micro-algues bleues ou cyanobactéries) et eucaryotes (micro-algues vertes, rouges et brunes). Les micro-algues eucaryotes possèdent une structure cellulaire végétale classique compartimentée, avec ou sans paroi cellulosique, et avec des pigments photosynthétiques renfermés dans les chloroplastes. Les micro-algues procaryotes ont une structure bactérienne classique sans compartiment, les pigments photosynthétiques sont contenus dans des membranes lamellaires. D'un point de vue taxonomique, le classement des micro-algues se fait sur la diversité de leurs propriétés et notamment leurs caractéristiques morphologiques, la

pigmentation ou encore l'organisation des membranes (G. E. Fogg, 1953). Il est cependant plus simple de les distinguer selon deux groupes.

- **Les procaryotes** : ce sont des organismes unicellulaires qui sont dépourvus de noyau et ne présentent que très rarement des organites cellulaires.
 - *Les Cyanophycées* : appelées également cyanobactéries, sont des micro-algues procaryotes de coloration bleu-verte de petites tailles (10 µm) qui peuvent se développer dans quasiment tous les habitats : eaux douces, salées, saumâtres et également dans les sols grâce à leur capacité à résister aux conditions climatiques extrêmes. Malgré ses aptitudes à se développer dans des milieux extrêmes, les Cyanophycées possèdent des températures de croissance optimales aux alentours de 30-35°C. La seule exigence des Cyanophycées est la présence obligatoire de lumière c'est pourquoi on les considère comme des organismes autotrophes obligatoires. En cas d'absence de lumière, certaines espèces de Cyanophycées sont en mesure d'oxyder certains sucres présents dans leur composition. De façon générale, elles emmagasinent principalement leur énergie sous forme d'amidon ou encore sous forme de lipides. Elles sont environ 2000 espèces dans ce groupe pouvant être divisées en 150 genres. Les espèces les plus connues sont *Spirulina*, *Nostoc commune* et *Aphanizomenom flos-aquae* (Pulz and Gross, 2004).

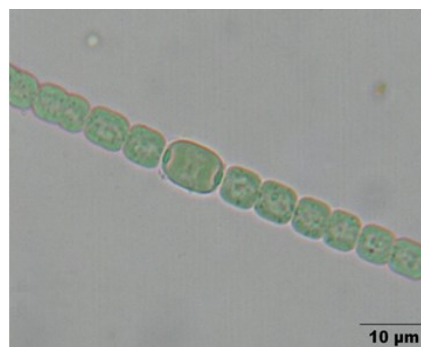


Figure I-1 : Photographie d'une Cyanobactérie *Anabaena* (<http://www.dr-ralf-wagner.de>)

- **Les Eucaryotes** : Ce sont des organismes uni ou pluricellulaires qui présentent une structure complexe contenant un noyau entouré d'une membrane ainsi que plusieurs organites intracellulaires : chloroplastes, amyloplastes, oléoplastes, ... (Figure I-2).

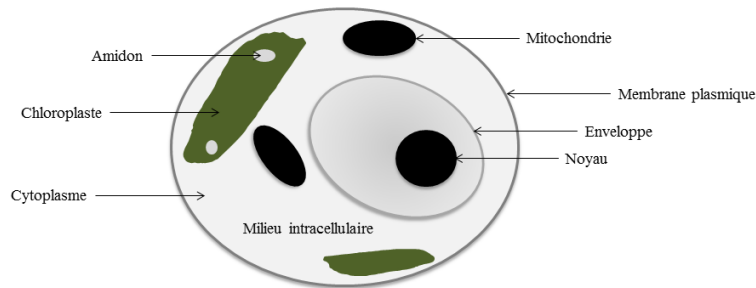


Figure I-2 : Schéma d'une structure de micro-algue unicellulaire

- *Les Diatomées* : appelées également les *Bacillariophycées* qui représentent le groupe majoritaire des diatomées et sont très répandues dans tous les types d'habitats. Plus de 100 000 espèces sont connues et il en existerait plus d'un million. Les *Bacillariophycées* sont unicellulaires et mesurent de 2µm à 1mm. Ils emmagasinent leurs réserves sous forme de *chrysolaminaran*, un polysaccharide, ainsi qu'en lipides. Ces espèces sont d'ailleurs reconnues pour leur contenu en acides gras et pendant plusieurs années, les scientifiques croyaient que les lipides représentaient leurs seuls composés de réserve. Les composants majeurs de ces lipides sont les triglycérides. Les micro-algues telles que *Nitzschia sp.* et *Navicula pelliculosa* (Figure I-3) sont intéressantes pour la production de biocarburant en mode hétérotrophe grâce à leur taux élevé en acides gras (Chinnasamy et al., 2010).



Figure I-3 : Photographie d'une Bacillariophycée *Navicula* (<http://www.plancton-du-monde.org>)

- *Les Chlorophycées* : ce sont des micro-algues vertes retrouvées dans tous les types d'habitat et, l'amidon et les lipides représentent leurs principales réserves énergétiques. Les espèces présentes dans ce groupe peuvent à la fois avoir un métabolisme autotrophe ou hétérotrophe. L'espèce la plus répandue et la plus étudiée actuellement est *Chlorella vulgaris* mais on peut également citer *Chlamydomonas*, *Dunaliella* et *Haematococcus* (Figure I-4) (Pulz and Gross, 2004).

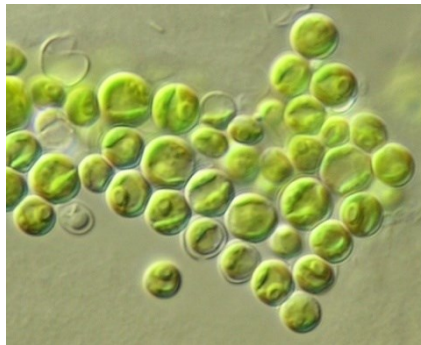


Figure I-4 : Photographie d'une Chlorophycée *Chlorella vulgaris*
(http://botany.natur.cuni.cz/alg/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm)

- *Les Chrysophycées* : appelées aussi algues dorées (Figure I-5), elles se retrouvent surtout en eaux douces et on en compte environ 1 000 espèces. Elles sont pourvues de chlorophylle a et c et de caroténoïdes jaunes. Elles ressemblent aux diatomées mais elles peuvent arborer plus de couleurs que ces dernières : du jaune au brun en passant par l'orange.



Figure I-5 : Photographie d'une Chrysophycée *Dinobryon* (<http://www.microscopy-uk.org.uk>)

- *Les Rhodophycées* : elles représentent les algues rouges ; il en existe près de 4000 espèces qui se développent essentiellement dans les eaux saumâtres voire salées. La plupart des Rhodophycées sont des organismes photo-autotrophes qui ont besoin de lumière et de CO₂ pour se développer (Figure I-6).



Figure I-6 : Photographie d'une Rhodophycée *Rhodorus marinus* (<http://www.ecosociosystemes.fr>)

- *Les Euglenophycées* : Il existe près de 800 espèces d'Euglenophycées qui sont retrouvées généralement dans les eaux saumâtres et douces. Ces algues sont essentiellement constituées de *paramylon*, substance glucidique, et d'huile. Il est difficile de définir un mode de culture pour ces algues qui peuvent croître autant en milieu autotrophe qu'en milieu hétérotrophe notamment pour l'espèce *Euglena gracilis* (Figure I-7). En absence de lumière, les Euglenophycées produisent une substance contenant des acides organiques, de l'acétate, de l'alcool et des sucres, possédant un réel intérêt pour la production d'acides gras.



Figure I-7 : Photographie d'une Euglenophycée *Euglena* (<http://protist.i.hosei.ac.jp>)

I.2. Composition biochimique des micro-algues

L'intérêt des micro-algues se manifeste par la diversité de leurs compositions biochimiques. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en lipides, protéines, polysaccharides, vitamines, pigments et antioxydants. Le Tableau I-1 recense la composition chimique de différentes micro-algues.

Tableau I-1 : Compositions biochimiques de micro-algues (Becker, 2007)

Micro-algues	Protéines (%)	Polysaccharides (%)	Lipides (%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Elles représentent une source importante de quasiment toutes les vitamines essentielles : B1, B6, B12, C, E, K1, et possèdent un large panel de pigments, fluorescents ou non, pouvant aussi avoir un rôle d'antioxydants. En plus de la chlorophylle (0,5 à 1% de la matière sèche) qui est le pigment photosynthétique primaire chez toutes les algues photosynthétiques, on trouve toute une gamme de pigments supplémentaires de type caroténoïdes (0,1 à 0,2% de la matière sèche) et phycobiliprotéines (phycoérythrine et phycocyanine). Les pigments principalement exploités sont la phycocyanine de la spiruline (colorant bleu), la phycoérythrine (couleur rouge) de *Porphyridium purpureum*, l'astaxanthine d'*Haematococcus pluvialis* ou le β -carotène de *Dunaliella salina*.

Le contenu élevé en protéines, peptides et acides aminés (entre 12 et 65% de matière sèche) de plusieurs espèces de micro-algues est une des principales raisons pour les considérer comme une source non conventionnelle de protéines dans l'alimentation humaine et animale (pisciculture).

Certaines espèces présentent aussi une richesse en oligosaccharides et polysaccharides qui présentent une très grande variété de structure et de molécules (unités glucuroniques) ainsi que les fonctions associées (sulfates). Les hydrolysats et les fractions de grands polysaccharides peuvent présenter des activités biologiques (activité antivirale, antibiotique, ou anti-prolifératrice) chez l'homme.

Les micro-algues peuvent accumuler plus de 80% de leur poids sec en lipide (Liu et al., 2008). Les lipides marins peuvent être classés selon deux catégories différentes basées en fonction de leur polarité : d'une part, les lipides neutres comprenant les acylglycérols (monoacylglycérol ou MAG, diacylglycérol ou DAG, triacylglycérol ou TAG) et les acides gras libres (AGL) et d'autre part, les lipides polaires qui peuvent être subdivisés en deux ; les glycolipides (GL) et les phospholipides (PL). Les MAG et les DAG proviennent de la dégradation des TAG.

En effet, en conditions de carence, les TAG vont s'accumuler et constituer un élément de réserve pour la micro-algue alors que les GL et les PL sont dits lipides de constitution. Une cellule carencée en macronutriment comme l'azote, va stocker le flux de carbone provenant de la photosynthèse sous forme de lipides. Les TAG constituent les lipides de choix pour une application en biodiesel (Hu et al., 2008).

La molécule de TAG est constituée d'un motif glycérol possédant trois fonctions hydroxyles sur lesquelles sont estérifiées trois chaînes d'acides gras et la molécule de PL possède un groupement phosphate sur une des trois fonctions hydroxyles (Figure I-8).

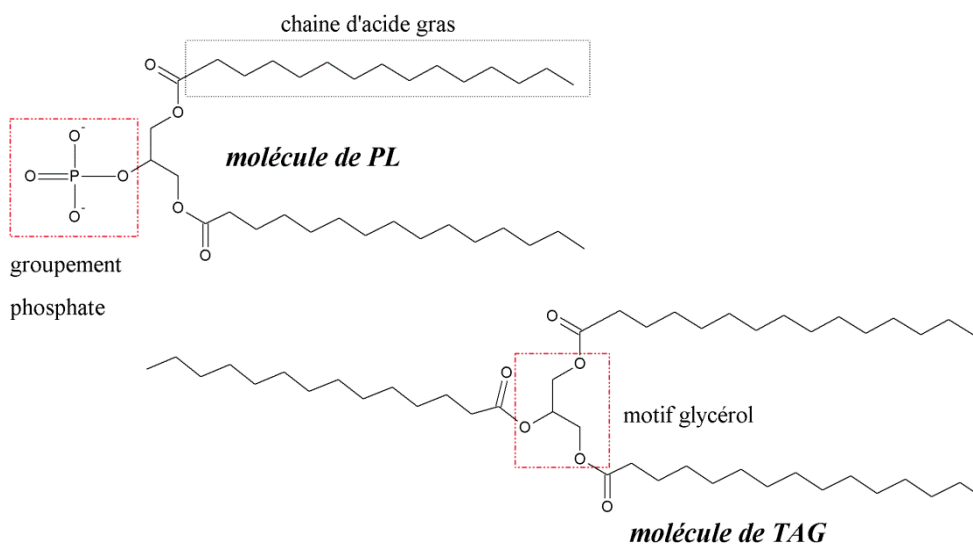


Figure I-8 : Structure chimique d'un TAG et d'un PL

Les lipides polaires et neutres des micro-algues eucaryotes sont constitués d'Acides Gras PolyInsaturés (AGPI) à longue chaîne et peuvent contenir 1 à 6 doubles liaisons généralement de forme *cis*. La composition en acides gras est homogène au sein

d'une même classe d'algues. Certains acides gras sont des descripteurs spécifiques de communautés phytoplanctoniques et la composition en acides gras des espèces peut présenter un intérêt taxonomique. Il est généralement admis que les procaryotes sont dépourvus d'AGPI, à l'exception des cyanobactéries dont la longueur des chaînes d'acides gras ne dépasse pas 18 carbones. D'une manière générale, les micro-algues d'eau douce possèdent des AGPI avec des longueurs de chaîne de 16 à 18 carbones avec 2 et 3 insaturations et les micro-algues marines, des AGPI avec des longueurs de chaîne allant de 16 à 24 carbones avec 2, 3, 4 et 6 insaturations. A l'exception de *Botryococcus braunii* qui peut posséder des chaînes en C34 (Metzger et al., 1985). Plus spécifiquement, les micro-algues synthétisent dans des proportions relatives variables selon leur classe taxonomique des AGPI n-3 (DHA et EPA), plus communément connus sous le nom d'acides gras ω 3. L'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) sont deux acides gras hautement insaturés de la série ω 3 (AGHI- ω 3) dont l'importance nutritionnelle est reconnue et qui présentent de fortes potentialités en terme d'applications thérapeutiques (Figure I-9) (Uauy and Valenzuela, 2000).

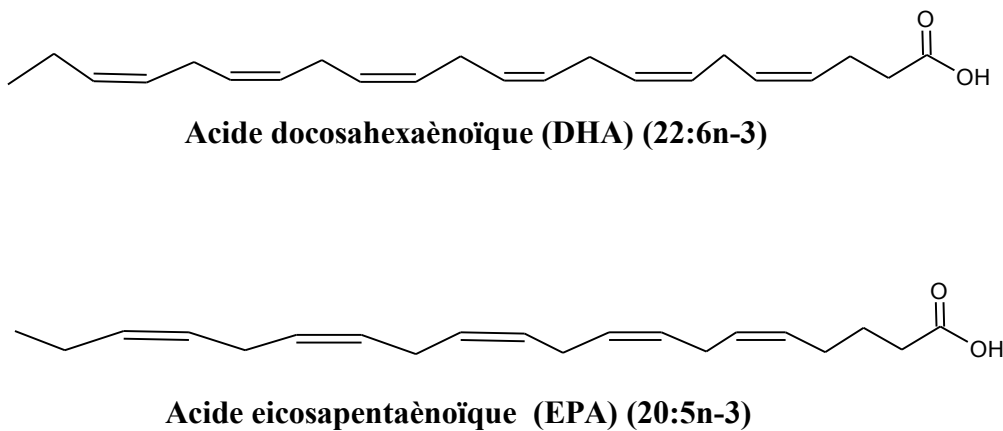


Figure I-9 : Structures chimiques de DHA et EPA

I.3. Culture des micro-algues

La production de micro-algues est en forte augmentation à travers le monde. La production annuelle est estimée à 6 000 tonnes par an de matière sèche (Pulz, 2001). La culture des micro-algues à grande échelle peut être conduite selon deux modes, soit à l'aide de bassins ouverts à haut rendement, le raceway ou dans une enceinte transparente fermée utilisant la lumière naturelle ou artificielle, le photo-bioréacteur.

I.3.1. Culture en milieu ouvert ou raceway

Les systèmes de culture en milieu ouvert (bassins, « raceways ») sont des étangs de recirculation en boucle fermée avec une profondeur de quelques dizaines de centimètres. Ce sont des technologies simples et présentant peu d'investissement initial (Figure I-10). Le mélange et la circulation du milieu sont possibles grâce à une roue à aube : le flux est guidé par la vitesse de rotation de cette roue. Un bullage permet un apport en CO₂ mais le transfert dans la phase liquide est souvent compliqué à cause de la faible profondeur des bassins. La température du milieu fluctue selon les cycles diurnes (nuit) et saisonniers. Toutefois peu d'espèces de micro-algues peuvent être cultivées en milieu ouvert de manière mono-spécifique. Pour toute culture selon ce mode, la principale contrainte est le risque de contamination par d'autres espèces de micro-algues ou d'autres micro-organismes comme des bactéries. C'est pourquoi, les cultures actuelles se faisant à ciel ouvert concernent des espèces de micro-algues poussant dans des milieux très sélectifs telles que *Dunaliella salina* qui se développe en milieu hypersalin. Les rendements atteints avec ces systèmes ne sont pas optimaux à cause de la difficulté à contrôler les facteurs environnementaux (hauteur de la lame d'eau, échauffement du bassin, phénomènes d'évaporation, etc...). La concentration en biomasse pour ce type de culture est généralement peu élevée car l'agitation du milieu est faible et des zones non agitées peuvent subsister. C'est ce mode de culture qui a été choisi pour la culture des micro-algues dans le projet Salinalgue (Figure I-11).



Figure I-10 : Bassins de culture de micro-algues. A gauche : bassin en boucle fermée, infrastructure de Roswell, Nouveau Mexique (USA) (Weissman et al., 1988). A droite : bassins circulaires d'environ 500 m², production de chlorelle (Chlorella Industries, Japon) (Lundquist et al., 2010)



Figure I-11 : Bassins construits dans le cadre du projet Salinalgue à Gruissan (Aude, France)

I.3.2. Culture en milieu fermé ou photo-bioréacteur tubulaire (PBR)

Le photo-bioréacteur tubulaire (PBR) est une association de plusieurs tubes transparents en plastique ou en verre (Figure I-12). La source de lumière peut être naturelle ou artificielle. Les tubes sont généralement de 10 cm de diamètre, facilitant la pénétration de la lumière à l'intérieur du tube. Ce milieu clos et hermétique évite les contaminations extérieures et permet la production de biomasse à large échelle (Carvalho et al., 2006; Pulz, 2001). L'injection d'air permet de fournir du carbone sous forme de CO₂, de brasser le milieu et d'évacuer les poches d'oxygène toxique pour les micro-algues. Un système de dégazage est nécessaire pour évacuer l'oxygène accumulé toxique pour les micro-algues (Figure I-13). La suspension micro-algale circule du réservoir jusqu'aux tubes qui vont capter la lumière puis des tubes vers le réservoir ; la culture se fait de façon continue. Dans le cas de la lumière naturelle, l'arrangement des tubes se fait souvent du nord vers le sud pour assurer un ensoleillement maximal et parallèle ou horizontal pour que chaque tube puisse recevoir le même taux d'ensoleillement (Sánchez Mirón et al., 1999). La lumière artificielle des PBR est techniquement réalisable mais elle représente un coût important comparé à la lumière naturelle. Le contrôle de la température est un élément important à prendre en compte pour les photo-bioréacteurs. Un système d'échangeur de chaleur est nécessaire pour refroidir le milieu de culture qui est recyclé. Les systèmes fermés permettent d'exploiter une gamme de micro-algues plus larges, d'atteindre de meilleurs rendements

et de s'affranchir des problèmes de contaminations. Les coûts de production via cette méthode sont cependant beaucoup plus élevés qu'en bassin ouvert. Ce mode de culture est réservé aux micro-algues à hautes valeurs ajoutées.



Figure I-12 : Photographies de différentes installations de PBR tubulaires. A gauche : PBR hélicoïdal, vertical Murdoch University, Australie (Chisti, 2007). A droite : PBR tubulaire horizontal immergé dans l'eau, Solix's Lumian™ Algae Growth System

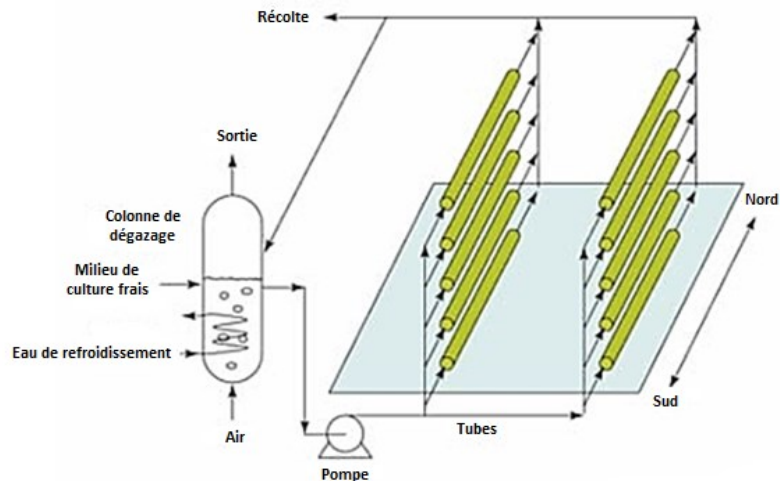


Figure I-13 : Schéma de principe d'un PBR

I.4. Récolte des micro-algues

La récolte est une étape limitante de nombreuses voies de valorisation des micro-algues. En effet, les micro-algues ont une taille le plus souvent de l'ordre du micron et leur récolte n'est pas aisée. Cette étape peut s'avérer coûteuse et représenter une part économique importante dans le coût d'un procédé à échelle industrielle (Mata et al., 2010). La récolte peut se faire par centrifugation, filtration, floculation, sédimentation ou flottation.

I.4.1. La centrifugation

Cette technique de concentration utilise la force centripète afin de permettre la séparation des micro-algues avec le milieu de culture par simple différence de densité. Selon Park et al. (2011), la centrifugation est efficace à 90% et le taux de récupération est directement lié au débit fixé en amont. Cette méthode est rapide et efficace, et représente une des méthodes les plus utilisées à l'échelle industrielle. Cependant, cette méthode est coûteuse en énergie ce qui la rend difficilement réalisable économiquement (Rawat et al., 2011). De plus, l'exposition des cellules à cette force centripète peut également les endommager (C.-Y. Chen et al., 2011).

I.4.2. La sédimentation

La sédimentation est une technique qui repose sur le principe de gravité. Les cellules en suspension dans le milieu vont être soumises à la gravité et vont former dans la partie inférieure un dépôt de particules solides et dans la partie supérieure une phase liquide. Les micro-algues de grande taille et de forte densité vont pouvoir être récoltées par sédimentation comme par exemple la spiruline. La vitesse de sédimentation peut être nettement améliorée grâce à l'ajout de flocculants (C.-Y. Chen et al., 2011; Uduman et al., 2010).

I.4.3. La filtration

Dans cette méthode, la suspension micro-algale passe au travers d'un filtre, en ne retenant que les cellules. Il existe différentes formes de filtration ; la microfiltration, la filtration sous vide, sous pression, l'ultrafiltration et la filtration à flux tangentiel. Le choix du type de filtration sera dépendant de la taille de l'espèce à récolter. En dépit d'être des méthodes de récoltes attractives, d'un point de vue énergétique, la microfiltration et la filtration sous vide sont coûteuses en énergie. Le pompage de la biomasse demande une dépense énergétique élevée ainsi que le remplacement des membranes souvent victimes de colmatage.

I.4.4. La floculation

La floculation est un procédé dans lequel les particules en solution se rejoignent afin de former des agrégats appelés « floes » (Uduman et al., 2010). Lorsque la floculation est combinée à la sédimentation ou à la filtration son efficacité est nettement augmentée (Rawat et al., 2011).

I.4.5. La flottation

La flottation est un procédé basé sur la gravité, dans lequel des bulles de gaz sont liées aux particules solides (cellules micro-algales) leur permettant ainsi de « flotter » à la surface. Des études ont montrées que le système de flottation pour la récolte des micro-algues était une méthode efficace pour les cellules de petites tailles comme *Nannochloropsis oculata* (Rawat et al., 2011). Il existe la flottation à air dissout et la flottation à air dispersé (C.-Y. Chen et al., 2011).

Dans le procédé de flottation à air dissout, les bulles d'air ont une taille réduite de 10 à 100 μm (C.-Y. Chen et al., 2011). Les bulles d'air passent à travers le milieu, adhèrent entre elles, se lient sur les particules et ainsi augmentent leur flottabilité, et créent des « floes » à la surface où une zone de « compactage » est formée (Park et al., 2011).

Dans le procédé de flottation à air dispersé, une injection d'air et une forte agitation forment des bulles de 700-1500 μm à l'intérieur du milieu. Ces bulles vont « réagir » avec les charges négatives des cellules de micro-algues (C.-Y. Chen et al., 2011). Cette

technique peut être améliorée avec l'ajout de surfactants cationiques qui vont amener au milieu une charge positive (Rawat et al., 2011).

I.5. Les procédés d'extraction des lipides pour une application biodiesel

Le potentiel des micro-algues à visée biodiesel est maintenant bien établi. Cette voie suscite l'intérêt et l'espoir des chercheurs. La Figure I-14 décrit le concept de production d'huile de micro-algues en vue d'obtenir du biodiesel. Ce procédé comporte une étape de production de biomasse micro-algale, de récolte, concentration, d'extraction des lipides puis transformation en biodiesel.

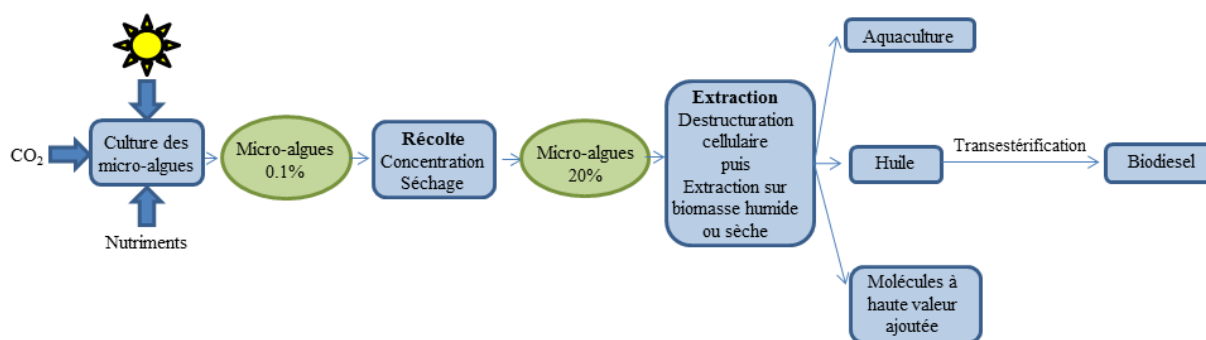


Figure I-14 : Concept de production d'huile de micro-algues visant à obtenir du biodiesel

L'étape d'extraction de l'huile algale demeure une étape critique dans la production de biocarburants pour laquelle des efforts importants sont à apporter. Compte tenu de la taille des micro-algues, les techniques de pressage à froid, utilisées dans le domaine des oléagineux, sont inefficaces. D'autre part, le procédé d'extraction est affecté par la présence d'eau à tous les stades et toutes les échelles du procédé. Nous savons que l'eau et les lipides sont d'excellents candidats à la formation d'une émulsion. En outre, il a été prouvé que sécher la biomasse au niveau industriel n'est pas envisageable d'un point de vue énergétique et économique (Lardon et al., 2009). En effet, il est estimé que le plus faible coût pour l'huile extraite de biomasse se situe à environ 2,80 \$/Litre, alors que l'huile de palme se vendait à 0,52 \$/Litre en 2006 (Chisti, 2007). Il est donc aujourd'hui primordial d'orienter les recherches vers l'utilisation de biomasse algale humide contenant 80% d'eau dans les procédés d'extraction.

Aujourd'hui, on recense de nombreuses méthodes d'extraction de la fraction lipidique de la biomasse algale. Ces techniques sont, cependant, davantage dédiées à l'échelle du laboratoire que dans un but de production industrielle ; elles servent tout de même de point de départ au développement d'un procédé d'extraction industriel.

Parmi ces techniques, il existe :

- L'extraction par solvant organique
- L'extraction par CO₂ supercritique
- L'extraction par eau sub-critique

I.5.1. L'extraction par solvant organique

Les lipides des micro-algues sont stockés au sein des cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi. Leur extraction nécessite donc souvent une étape visant à rompre les parois cellulaires afin de les rendre accessibles aux solvants. Pour ce faire, plusieurs traitements sont possibles : le broyage, les ultrasons (Ehimen et al., 2012; Kim et al., 2013), les micro-ondes (Koberg et al., 2011), les chocs osmotiques, la lyse enzymatique, etc... (Cho et al., 2013; Yoo et al., 2012). Le choix de la technique d'éclatement dépend principalement des caractéristiques cellulaires et du taux de matière sèche de la biomasse algale.

Les lipides sont généralement extraits par un solvant organique non miscible à l'eau tels que le n-hexane, chloroforme, éther de pétrole, etc... ou d'un mélange de solvants sur la base de la méthode développée par Bligh et Dyer (1959) (Bligh and Dyer, 1959).

L'extraction peut également être optimisée par une intensification des conditions de température et de pression permettant ainsi d'augmenter le pouvoir de solvation du solvant mis en jeu (C.-Y. Chen et al., 2011; Walker et al., 1999).

I.5.1.1. Principes de base

Lors d'un processus de dissolution, les molécules de solvant et de soluté doivent avoir assez d'affinité pour que ces dernières se répartissent de manière uniforme dans le solvant. Les forces de cohésion des deux espèces en présence doivent donc être

semblables pour que la solution s'établisse spontanément avec très peu d'énergie. Ce principe général de dissolution s'énonce souvent par l'expression « le semblable se dissout dans le semblable », ou « *like dissolves like* » en anglais, qui signifie que deux substances sont d'autant plus aptes à former une solution que leurs constitutions chimiques respectives présentent le plus d'analogies (George Wypych, 2001).

I.5.1.2. Paramètres de solubilité

Parmi la myriade de paramètres thermodynamiques (indice de polarité, valeur de Kauri-butanol et paramètre de solubilité de Hildebrand) qui tentent de prédire la solubilité d'un soluté dans un solvant, les paramètres de solubilité de Hansen (HSP) semblent être l'un des plus largement acceptés (Gupta et al., 1997; Hansen, 2008; Snyder, 1978). La caractérisation des paramètres de solubilité d'Hansen permet de prédire si un soluté se dissout ou non dans un solvant, si les molécules de chaque substance ont une force similaire d'interaction.

Avec le système HSP (Hansen Solubility Parameters), l'énergie totale de cohésion (E) peut être quantitativement divisée en trois composantes (Hansen, 2008); la dispersion atomique ou forces de Van der Waals (E_D), les interactions dipolaires moléculaires (E_P) et les interactions (échange d'électrons) de liaison hydrogène moléculaire (E_H).

$$E = E_D + E_P + E_H$$

E est déterminé expérimentalement en mesurant l'énergie nécessaire pour évaporer le liquide (soluté ou solvant), brisant ainsi toutes ses liaisons cohésives.

En divisant par le volume molaire V, on obtient ainsi les trois composantes des paramètres de solubilité d'Hansen

$$E/V = (E_D/V) + (E_P/V) + (E_H/V)$$

où $E/V = \delta^2$, $E_D/V = \delta_D^2$, $E_P/V = \delta_P^2$ et $E_H/V = \delta_H^2$

$$\delta^2 = \delta_D^2 + \delta_P^2 + \delta_H^2$$

où δ : paramètre de solubilité de Hildebrand

δ_D : paramètre de dispersion

δ_P : paramètre dipolaire

δ_H : paramètre de liaison hydrogène

L'unité SI pour l'ensemble des paramètres est $\text{MPa}^{1/2}$.

La caractérisation HSP peut être également visualisée avec une représentation sphérique (Figure I-15). Les paramètres de solubilité d'Hansen du soluté sont au centre de la sphère de la solubilité et le rayon de la sphère de solubilité (R_o) indique l'étendue de l'interaction pour la solubilisation en question. Les solvants capable de dissoudre le composé cible se situent dans la sphère de la solubilité et ceux qui ne relèvent pas d'affinité se trouvent en dehors de la sphère. R_a est la distance du solvant au centre de la sphère.

$$R_a^2 = 4(\delta_{DS} - \delta_{DP})^2 + (\delta_{PS} - \delta_{PP})^2 + (\delta_{HS} - \delta_{HP})^2$$

L'indice « S » est pour le solvant et l'indice « P » pour le soluté. Si $R_a < R_o$, le solvant se situe dans la sphère de la solubilité et le soluté est soluble dans le solvant. La différence d'énergie relative (Relative Energy Difference, $RED = R_a/R_o$) est une représentation numérique de cette visualisation graphique. Plus la valeur RED est petite, plus le solvant est capable de dissoudre le soluté.

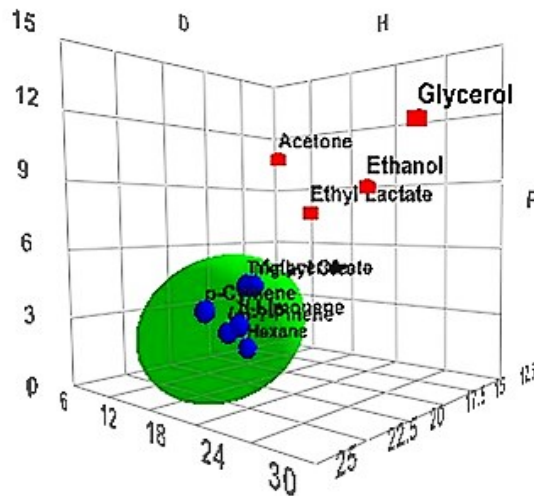


Figure I-15 : Représentation de la sphère de solubilité d'Hansen pour l'extraction des triglycérides

Pour un mélange de solvants, le paramètre de solubilité d'Hansen, δ_i , est calculé comme suit :

$$\delta_{i \text{ mélange}} = \varphi_1 \delta_{i,1} + \varphi_2 \delta_{i,2} + \dots$$

où i : une des trois composantes des paramètres de solubilité Hansen
 φ : fraction volumique de chaque solvant dans le mélange

I.5.1.3. Sélection de solvants organiques

Le solvant d'extraction idéal des lipides marins doit non seulement satisfaire les critères mentionnés précédemment mais aussi posséder un point d'ébullition faible afin de faciliter son élimination.

Le mélange chloroforme/méthanol (1/2 : v/v) est le solvant le plus fréquemment utilisé pour l'extraction des lipides à partir de tissus vivants. Cette procédure est connue sous le nom de méthode de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959) qui constitue, aujourd'hui, dans la littérature, la méthode de référence. Dans cette méthodologie, la présence de l'eau résiduelle de la micro-algue agit comme un co-solvant permettant l'extraction des lipides polaires et neutres. Après filtration des débris cellulaires, la phase inférieure (chloroforme et méthanol) contient les lipides (neutres et polaires) et la phase supérieure (eau et méthanol) contient les composés non lipidiques tels que les protéines et les polysaccharides (Medina, 1998).

En outre, la technique d'extraction au Soxhlet constitue également une méthode très utilisée (Ranjan et al., 2010).

D'autres mix de solvants tels que le n-hexane/éthanol (Fajardo et al., 2007) le n-hexane/isopropanol (Nagle and Lemke, 1990) ont montré un potentiel intéressant sur les micro-algues.

Il existe, par ailleurs, un procédé d'extraction de lipides de micro-algues fraîches biocompatible qui permet de garder les cellules vivantes lors de l'étape d'extraction. Dans ce cas, les algues sont mises en contact avec un solvant organique d'extraction, le décane, et on procède à une opération d'extraction liquide/liquide, suivie d'une séparation de phases. Les algues traitées sont ensuite remises en culture, avec dans certains cas des taux de survie proches de 100%. Ce procédé est appelé le « milking » (Hejazi and Wijffels, 2004).

Dans une étude réalisée par Lee et al. (1998), cinq mélanges de solvants organiques pour l'extraction de lipides à partir de cellules de *Botryococcus braunii* ont été comparés (Lee et al., 1998). Le mélange chloroforme/méthanol permet d'obtenir le meilleur rendement lipidique de l'ordre de 0,29 g/g de biomasse sèche.

Toutefois ces différentes procédures ont des limites car elles nécessitent l'utilisation d'une biomasse sèche et ne sont pas toujours transposables à l'échelle industrielle du fait des volumes importants de solvant mis en jeu et de leur toxicité vis-à-vis de l'opérateur et de l'environnement. Actuellement, le n-hexane est utilisé industriellement pour extraire les lipides qu'ils soient d'origine végétale ou marine. Cependant, compte tenu des problèmes environnementaux et de santé publique qu'il engendre, il est urgent d'explorer des alternatives à ces solvants d'origine pétrolière.

I.5.1.4. Les agrosolvants

Les solvants « verts » ou agrosolvants constituent une voie potentielle de substitution au n-hexane issus de matières premières renouvelables, ils présentent l'avantage d'offrir une alternative aux ressources fossiles et un bilan environnemental positif. Ils peuvent être produits à partir de biomasse telle que le bois, l'amidon, les huiles végétales, des fruits ou même des plantes aromatiques. Ils sont classés selon 3 catégories, les esters, les alcools et les terpènes. Certains d'entre eux ont déjà montré leur efficacité pour l'extraction d'huile d'oléagineux (Mamidipally and Liu, 2004; Temelli, 1992; Virot et al., 2008). Cependant, très peu de travaux ont été réalisés sur l'extraction des lipides de micro-algues. Dans la littérature, on peut relever les travaux de Zbinden et al. (2013) qui utilise l'acétate d'éthyle comme alternative pour l'extraction de lipides issus de *Ankistrodesmus falcatus*. L'équipe d'Ibanez et al. évalue le potentiel de l'éthyle lactate pour l'extraction d'une fraction enrichie en acide γ -linoléique de *Arthrospira platensis* (Golmakani et al., 2012).

C'est donc dans ce cadre que ce travail de thèse s'inscrit et plus particulièrement sur l'utilisation des solvants terpéniques comme solvants alternatifs au n-hexane pour l'extraction de lipides à partir de micro-algues.

I.5.1.5. Techniques de déstructuration des cellules

L'efficacité de l'extraction des lipides des micro-algues est étroitement liée avec le niveau de déstructuration de la cellule. Lorsque les cellules intactes sont déstructurées, les lipides intracellulaires sont libérés des structures cellulaires puis diffusent dans le milieu environnant. Les méthodes de déstructuration des cellules sont classées selon leur mode d'action mécanique ou non mécanique (Figure I-15) (Chisti and Moo-Young, 1986).

Les méthodes mécaniques/physiques comprennent le « bead mill », les ultrasons, l'autoclave, la lyophilisation et les micro-ondes, tandis que les méthodes non mécaniques mettent en jeu la lyse cellulaire par des enzymes, des traitements acides ou basiques ou des chocs osmotiques. Ces différentes techniques peuvent être utilisées pour assister l'extraction par solvant ou peuvent constituer un prétraitement avant l'étape d'extraction à proprement dite.

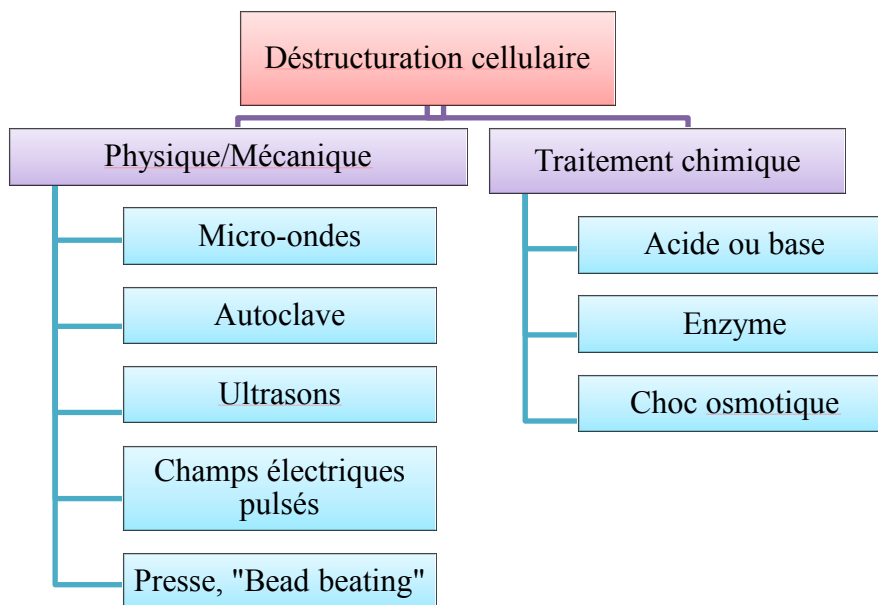


Figure I-16 : Les procédés de déstructuration cellulaire des micro-algues

- Le « bead mill » ou « bead beating »

Le « bead beating » aussi connu sous le nom de « bead mill », ou broyeur à perles, est une technique très simple de dégradation cellulaire ; cette technique consiste en une très forte agitation du milieu comprenant la solution de micro-algues et de solvant (une concentration de l'ordre de 100 à 200g/L) à traiter ainsi que des perles de quartz ou de métal (Mercer and Armenta, 2011). La collision et la friction de ces perles avec les cellules entraînent une déstructuration de ces dernières. C'est une technique très avantageuse en termes d'efficacité et de consommation énergétique et transposable à l'échelle industrielle (Figure I-16). Pour l'extraction des lipides de *Botryococcus braunii*, parmi l'ensemble des techniques testées le « bead beating » s'est révélé très efficace en prétraitement suivi d'une extraction chloroforme/méthanol (2/1: v/v) (Lee et al., 1998).

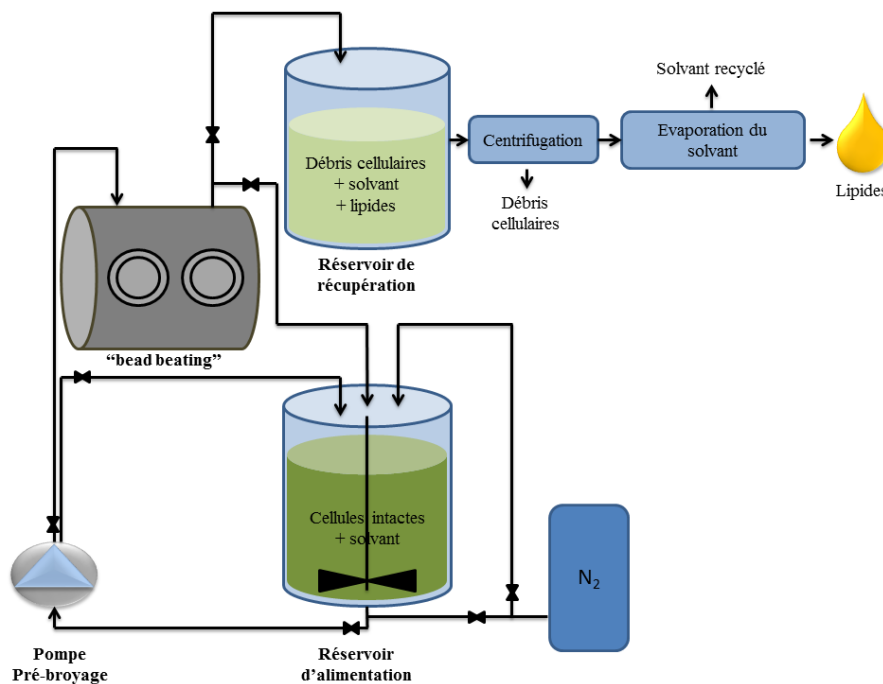


Figure I-17 : Procédé « bead beating »

- Les ultrasons

Les ultrasons ont l'avantage d'être une technique de déstructuration à basse température, conduisant ainsi à une diminution de la dénaturation thermique des composés sensibles. Les ultrasons sont aisément transposables industriellement et peuvent opérer de manière continu (Harrison, 1991). Quand les ultrasons à basse

fréquence sont appliqués dans un liquide c'est le phénomène de cavitation qui est responsable de l'endommagement des cellules; des micro-bulles transitoires implosent violemment après avoir atteint une taille critique. Les bulles permettent ainsi de déstructurer les cellules. L'efficacité des ultrasons dans le domaine de l'extraction des produits naturels n'est plus à démontrer.

Dans le domaine des micro-algues, les ultrasons ont montré leur efficacité sur la souche *Nannochloropsis sp.* sur laquelle ils sont appliqués (Wiyarno, 2010) dans un mélange micro-algues/solvant organique. Prabakaram et Ravindram (2011) ont réalisé une étude sur trois espèces de micro-algues sur lesquelles différentes méthodes de déstructuration ont été testées (autoclave, bead beating, micro-ondes, choc osmotique et ultrasons). Les ultrasons apparaissent comme être la technique de choix permettant d'obtenir le meilleur rendement lipidique. Des chercheurs (Gerde et al, 2012) ont étudiés la modulation des ultrasons sur la déstructuration des cellules de *Schizochitrium*, une micro-algue hétérotrophe et *Chlamydomonas r.*, une micro-algue autotrophe. La déstructuration cellulaire a été appréciée par un dosage rapide des lipides dans le milieu. Les ultrasons se sont révélés très pertinents jusqu'à une certaine puissance. Au-delà de celle-ci, il a été observé une oxydation des lipides.

- Les micro-ondes

Les micro-ondes ont la particularité de chauffer instantanément et préférentiellement des molécules polaires et notamment les molécules d'eau. Les cellules de micro-algues étant constitués de 65-85% d'eau, suite à une exposition aux micro-ondes, la cellule est sujette à des contraintes importantes qui entraînent une déstructuration des cellules et ainsi favorisant la libération des molécules d'intérêts. Le phénomène peut donc conduire à augmenter l'efficacité des procédures d'extraction de lipides de micro-algues. Cependant, les micro-ondes imposent de travailler à partir d'une biomasse humide. Une étude récente publiée par Balasubramanian et al. (2010) a montré que l'extraction assistée par micro-ondes de *Scenedesmus obliquus* a permis d'obtenir 77% de lipides alors que l'extraction au Soxhlet n'a conduit qu'à 47% de lipides. Par ailleurs, avec le procédé micro-ondes, le temps d'extraction a été considérablement réduit (30 min pour les micro-ondes contre 10 h pour le Soxhlet) et l'huile extraite présentait une meilleure qualité, contenant davantage d'oméga-3 et d'oméga-6.

L'étude de l'équipe de Lee et al (2010) a par ailleurs mis en évidence l'efficacité des micro-ondes par rapport à d'autres techniques (ultrasons, « bead beating », choc osmotique, autoclave) sur différentes micro-algues tels que *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* et *Scenedesmus* (Lee et al., 2010).

- Les champs électriques pulsés (CEP)

Les CEP constituent une autre technique potentielle dans laquelle les cellules sont exposées à de forts champs électriques pendant des laps de temps très courts. Les impulsions électriques rendent les cellules perméables, impliquant ainsi une augmentation du transfert de matière à travers les membranes. Cette technique très prometteuse peut être appliquée en prétraitement de la biomasse micro-algale avant l'extraction par solvant. Cette technique non thermique a déjà prouvé son efficacité sur l'extraction d'huile de colza (Guderjan et al., 2007). Très récemment, Zbinden et al., (2013) a montré l'efficacité des CEP sur l'extraction des lipides de la micro-algue *Ankistrodesmus falcatus*

- Les enzymes

Une alternative relativement plus sûre et consciencieuse de l'environnement, consiste à employer des enzymes pour rompre les parois cellulaires spécifiquement permettant ainsi une libération du contenu cellulaire sans altération des molécules présentes. Cependant, la difficulté est de choisir l'enzyme appropriée pour hydrolyser les cellules de micro-algues. Il est donc souhaitable de connaître la composition des parois cellulaires à traiter. L'équipe chinoise de Liang (Liang et al., 2012) a combiné avec succès l'emploi des enzymes en milieu aqueux avec des ultrasons pour l'extraction des lipides de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* et *Nannochloropsis*.

- Le choc osmotique

Une augmentation de la salinité dans un milieu aqueux est à l'origine d'un milieu hypertonique qui constitue un choc osmotique pour des micro-algues marines. En conséquence, la cellule va se contracter favorisant ainsi la diffusion du contenu cellulaire vers l'extérieur. Cette technique s'est révélée performante pour l'extraction des lipides de *Chlamydomonas r.* avec du NaCl ou du sorbitol comme agents osmotiques à différentes concentrations (Yoo et al., 2012). Cette approche a l'avantage

de ne pas nécessiter un séchage préalable de la biomasse et elle constitue un prétraitement efficace avant l'extraction par solvant organique.

I.5.2. L'extraction par CO₂ supercritique

Les fluides supercritiques sont utilisés au stade industriel depuis 30 ans (ex : café décaféiné) et se positionnent aujourd'hui comme une alternative aux techniques classiques d'extraction par solvant organique. La technologie des fluides supercritiques permet d'obtenir des extraits purs sans résidus de solvant et ne nécessite pas d'étape de séparation. Cependant, un des freins importants à la diffusion de la technologie est la lourdeur des investissements bien que leurs coûts aient baissés durant ces dernières années.

Les principes de bases de la technologie sont les suivants : quand la température et la pression d'un fluide vont au-delà de certaines valeurs critiques (T_c et P_c) on dit que ce fluide est à l'état supercritique (Figure I-18). A cet état, les fluides ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité à peine supérieure à celle des gaz et une diffusivité comprise entre celle des liquides et celle des gaz. Dans le domaine de l'extraction, c'est le CO₂ à l'état supercritique qui est le plus utilisé pour ces conditions critiques facilement accessibles (T_c = 31,1°C et P_c = 72,9 atm). Par ailleurs, il est peu coûteux, non toxique, ininflammable et chimiquement inerte.

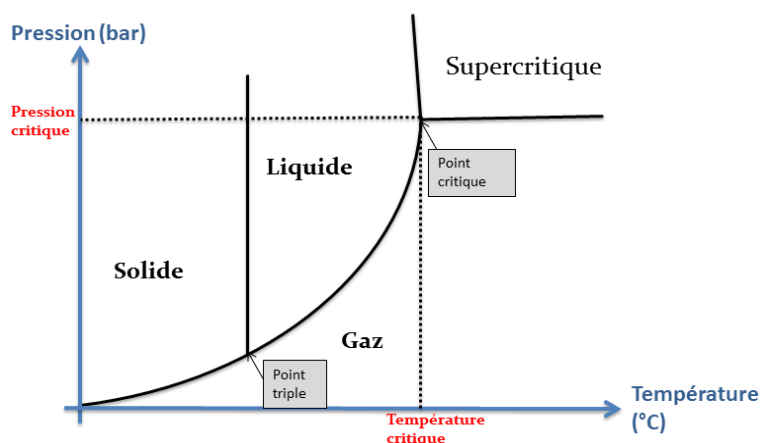


Figure I-18 : Diagramme d'équilibre de l'état supercritique

De manière pratique, la biomasse algale sèche, est placée dans un extracteur à travers duquel circule le CO₂ à l'état supercritique (Figure I-19). En fonction des conditions de température et de pression, le CO₂ va plus ou moins s'enrichir en

molécules d'intérêt. Les conditions opératoires seront choisies selon la polarité du soluté ciblé. Le mélange CO₂/soluté est acheminé vers le séparateur où le CO₂ est détendu et l'extrait isolé. Le CO₂, à l'état gazeux, traverse un échangeur froid où il se liquéfie pour être ensuite recyclé.

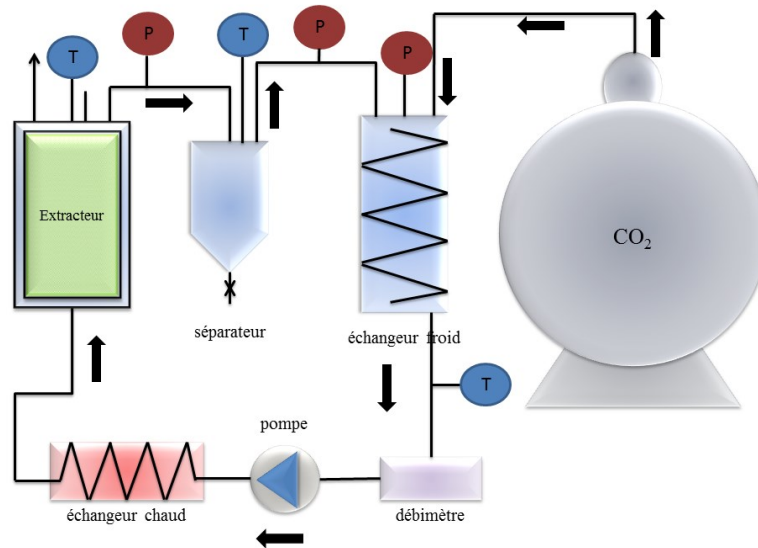


Figure I-19 : Schéma de principe d'une d'extraction par CO₂ supercritique

La technologie au CO₂ supercritique apparaît comme adaptée à l'extraction de lipides à partir de micro-algues pour les raisons suivantes :

- Un pouvoir solvant à géométrie variable

La solubilité d'une substance dans le CO₂ supercritique dépend de la masse volumique du fluide. Compte tenu de la compressibilité de ce fluide supercritique, la température et la pression de travail influencent la masse volumique, et par conséquent la solubilité des composés. Ce changement de masse volumique du fluide supercritique est à l'origine du pouvoir solvant à géométrie variable

- Un transfert de matière favorisé

Comme nous l'avons déjà mentionné, le fluide supercritique possède des propriétés intermédiaires entre l'état liquide et l'état gazeux. Ces dernières lui permettent ainsi de pénétrer très rapidement dans les cellules des micro-algues.

- L'obtention d'extrait sans résidus de solvant

L'extrait lipidique obtenu à partir d'une extraction au CO₂ supercritique est exempt de solvant. Ainsi aucune énergie n'est dépensée pour l'élimination de celui-ci.

L'utilisation de la technologie au CO₂ supercritique pour l'extraction des lipides de micro-algues est relativement récente (Subra and Boissinot, 1991) et depuis de nombreuses équipes ont confirmé le potentiel de cette technologie pour cette application (Andrich et al., 2005; Canela et al., 2002; Cheung, 1999; Halim et al., 2011; Herrero et al., 2006; Mendes et al., 2006, 2003; Mendiola et al., 2007; Sajilata et al., 2008; Thana et al., 2008). Une étude sur l'extraction des AGPI de l'espèce *Nannochloropsis oculata* a notamment pu valider un modèle mathématique pour décrire les cinétiques d'extraction (Andrich et al., 2005). Plus récemment, l'équipe du LM2P2 a évalué la robustesse du modèle mathématique de Sovova, sur l'extraction des lipides de quatre souches *Nannochloropsis oculata*, *Cylindrotheca closterium*, *Chlorella vulgaris* et *Spirulina plantensis* (Crampon et al., 2013; Mouahid et al., 2013).

I.5.3. L'extraction par eau sub-critique

L'extraction par eau sub-critique est basée sur l'utilisation de l'eau à une température inférieure à sa température critique (374°C), et à une pression suffisante pour permettre de maintenir son état liquide (Figure I-20). Dans ces conditions, les propriétés physico-chimiques de l'eau sont modifiées : amélioration du pouvoir solvant, diminution de la viscosité, modification de la polarité de l'eau et accroissement de la vitesse de diffusion.

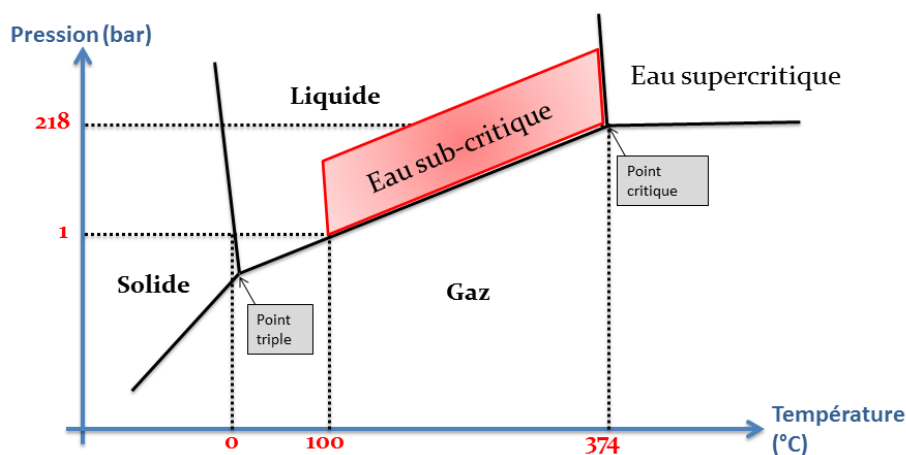


Figure I-20 : Diagramme d'équilibre de l'état sub-critique

Par ailleurs, l'eau à température ambiante est un solvant polaire qui possède une permittivité, ou constante diélectrique (ϵ') de 75.5. Elle ne solvate donc que très peu les molécules peu ou non polaires. Cependant, lorsque l'eau est chauffée dans une atmosphère pressurisée à des températures de l'ordre de 250-300°C, sa polarité diminue et sa constante diélectrique devient équivalente à celle du méthanol ($\epsilon' = 33$) ou de l'éthanol ($\epsilon' = 24$) (Teo et al., 2010). Ainsi l'eau sub-critique permet l'extraction de molécules moyennement polaires à non polaires sans utiliser de solvants organiques.

La mise en œuvre de ce procédé d'extraction à l'échelle du laboratoire peut se réaliser selon deux types :

- mode statique, en réacteur fermé (batch) et éventuellement agité. L'eau et le substrat à traiter sont mis en contact à la température souhaitée pendant un temps déterminé avant une phase de refroidissement (Figure I-21)
- mode dynamique, en réacteur semi-continu. Le substrat à traiter est placé en lit fixe à l'intérieur du réacteur tandis que l'eau sub-critique percole à travers le lit.

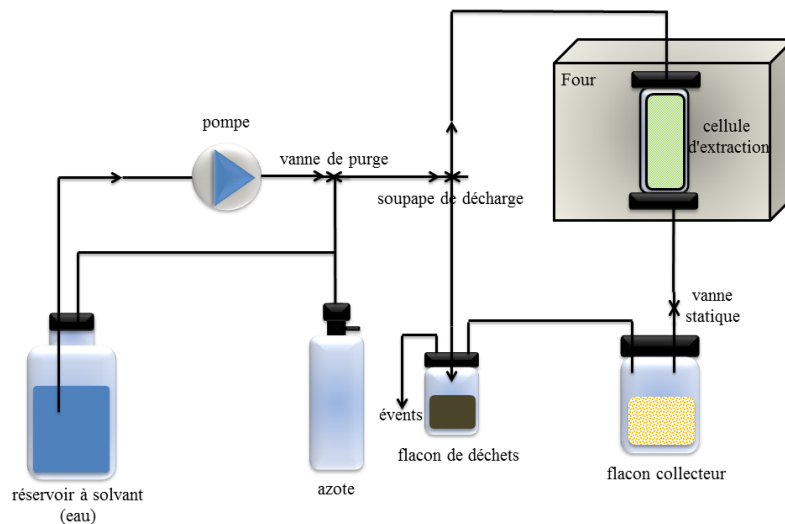


Figure I-21 : Schéma de principe d'une unité fonctionnant en mode statique

L'un des aspects les plus attractifs de cette technologie, dans le cas des micro-algues, est l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction, ce qui permet ainsi de s'affranchir de l'étape de séchage de la biomasse. Cette technique possède de nombreux avantages (1) une courte durée d'extraction, (2) une haute qualité des produits extraits,

(3) un faible coût des agents d'extraction et (4) une compatibilité environnementale (Herrero et al., 2006). Cependant, l'extraction des lipides de micro-algues par l'eau sub-critique nécessite souvent le recours à un co-solvant tel que l'éthanol afin de réduire la consommation d'énergie liée à l'extraction et d'augmenter le rendement d'extraction des lipides (M. Chen et al., 2011).

En outre, une des contraintes de cette technique est la difficulté à extrapoler le système à grande échelle. De plus, une charge importante en énergie est nécessaire pour chauffer le système jusqu'aux températures sub-critiques.

I.6. Applications et marchés potentiels des micro-algues

Les premières utilisations des micro-algues datent de 2000 ans en Chine, *Nostoc*, une Cyanobactérie, avait été utilisée comme nourriture afin de survivre à une famine (Spolaore et al., 2006). Toujours dans un contexte de pénurie alimentaire, en 1940, les chercheurs se sont intéressés aux micro-algues comme aliments pour leurs teneurs en protéines. En France, l'activité commence à la fin des années 1970 avec l'apparition des premières écloseries de mollusques et la production de micro-algues pour l'aquaculture. En 2005, la production mondiale toutes espèces confondues est estimée à 7000 tonnes de matière sèche par an. Aujourd'hui avec seulement quelques dizaines d'espèces cultivées, la production mondiale n'excède pas 10000 tonnes (Julie Person et al., 2011). Actuellement, les applications commerciales des micro-algues sont en plein essor. La diversité des espèces et la richesse en métabolites permet un large panel d'applications impliquant ainsi de nombreux secteurs industriels (Figure I-22 et Tableau I-2).

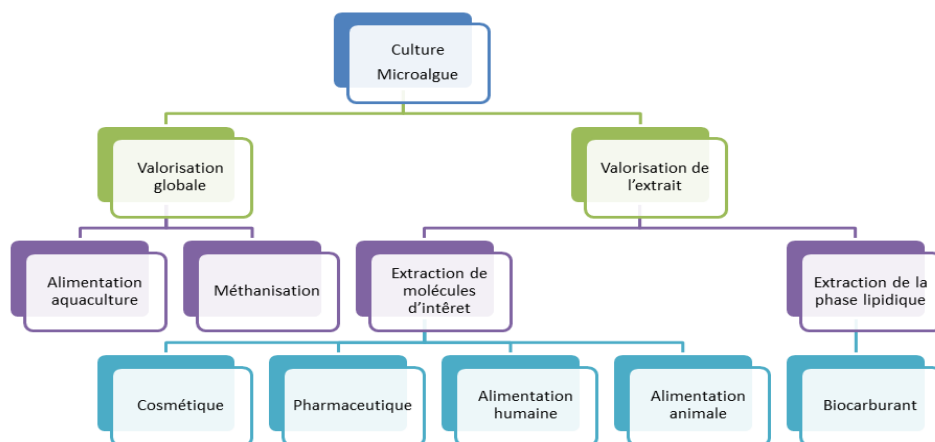


Figure I-22 : Les principales voies de valorisation des micro-algues

Tableau I-2 : Une sélection d'espèces de micro-algues avec leurs produits et domaines d'application (Pulz and Gross, 2004)

Espèces	Produits	Domaines d'application
<i>Spirulina</i> Cyanobactérie	Phycocyanine Biomasse	Aliments naturels Cosmétique
<i>Chlorella vulgaris</i> Chlorophycée	Biomasse	Aliments naturels Suppléments alimentaires Substituts alimentaires
<i>Dunaliella salina</i> Chlorophycée	β -carotène	Aliments naturels Suppléments alimentaires Substituts alimentaires
<i>Haematococcus pluviialis</i> Chlorophycée	Astaxanthine	Aliments naturels Suppléments alimentaires Substituts alimentaires
<i>Odontella aurita</i> Bacillariophycée	AGPI	Pharmaceutique Cosmétique Aliments pour enfants
<i>Porphyridium cruentum</i> Rhodophycée	Polysaccharides	Pharmaceutique Cosmétique Nutrition
<i>Isochrysis galban</i> Chlorophycée	AGPI	Nutrition animale
<i>Phaeodactylum tricorutum</i> Bacillariophycée	Lipides AGPI	Nutrition Production de carburants
<i>Lyngbya majuscula</i> Cyanobactérie	Immunomodulateur	Pharmaceutique Nutrition
<i>Muriellopsis sp.</i> Chlorophycée	Lutéine	Aliments naturels Suppléments alimentaires Substituts alimentaires

L'objectif de ce paragraphe est de montrer un aperçu des domaines d'applications de la filière micro-algue. Les applications sont plus ou moins abouties selon les domaines, certains sont encore à l'état de recherche.

I.6.1. Aquaculture

La production d'algues unicellulaires constitue un des éléments fondamentaux de toute opération d'écloserie (crustacés, mollusques, poissons). Elles peuvent servir de nourriture pour les bivalves (huitres, coquilles Saint-Jacques, moules, palourdes) tout au long de leur développement. Pour les crustacés et certaines espèces de poissons, elles sont utilisées au stade de larves ou juvéniles. Elles servent également d'alimentation de base pour la production du zooplancton (Brown et al., 1997; Muller-Feuga A., 2000). Les besoins nutritionnels en aquaculture sont différents à chaque stade (reproduction, élevage larvaire, grossissement). Les micro-algues riches en acides gras, acides aminés essentiels et multiples oligoéléments sont privilégiées en aquaculture car elles

apportent des composés essentielles que les animaux d'élevage aquacoles ne synthétisent pas (Robert et al., 2004).

I.6.2. Agriculture

La biomasse micro-algale peut également être valorisée comme engrais, fertilisant, stabilisateur de sol ou encore protecteur de cultures. Grâce à leur capacité à fixer l'azote, les micro-algues et plus particulièrement les cyanobactéries permettent de maintenir une fertilité des sols et des cultures. Les micro-algues ont également la capacité à influencer la croissance des plantes à partir de la synthèse de molécules bioactives (Borowitzka, 1995). Par exemple au Japon, *Chlorella vulgaris* est utilisée pour stimuler la biosynthèse de la chlorophylle afin d'améliorer la croissance des plantes.

I.6.3. Production de biomasse à but alimentaire

Une algue peut être intéressante d'un point de vue alimentaire si elle se rapproche de la composition chimique d'un aliment déjà connu. Elle ne doit pas présenter de toxines qui peuvent être naturelles ou accumulées lors de la production. La qualité de ses protéines va être un facteur important ainsi que leurs disponibilités et leurs valeurs nutritionnelles. Les micro-algues sont plus considérées comme des compléments alimentaires que comme des aliments à proprement dit. L'habilitation des micro-algues pour l'alimentation humaine porte en Europe essentiellement sur la Chlorelle et la Spiruline.

I.6.3.1. La Spiruline

La spiruline est une des micro-algues les plus cultivée mondialement (Figure I-23). La spiruline est un phytoplancton utilisé en alimentation humaine depuis l'Antiquité. Pouvant pousser dans des eaux saumâtres alcalines, riches en sels minéraux, elle a, en effet, constitué le seul complément en protéines, lipides insaturés et vitamines pour les populations des zones arides du bord du lac Tchad et d'Amérique centrale. Elle renferme environ 70% de protéines (poids sec), qui sont assimilables à plus de 95%, car la spiruline ne contient pas de cellulose. Ce taux est 4 fois plus important que celui du soja par exemple. La spiruline contient des acides gras essentiels, γ -linoléique et

linoléique que le corps ne sait pas synthétiser. Elle contient aussi des enzymes comme le SOD (superoxyde dismutase), des caroténoïdes, phycocyanine ainsi que plusieurs vitamines et minéraux (Desmorieux and Decaen, 2005; Rangel-Yagui et al., 2004; Soletto et al., 2005).

L'industrie agroalimentaire utilise la spiruline pour l'alimentation animale et la fabrication d'aliments diététiques, destinés, par exemple, aux régimes hyperprotéiques. Elle permet aussi de lutter contre la malnutrition, la dénutrition et les carences protéiques dans les pays en voie de développement.



Figure I-23 : Culture de Spiruline au Burkina Faso

I.6.3.2. La Chlorelle

La Chlorelle est une algue verte unicellulaire d'eau douce. Elle se distingue des autres végétaux par une exceptionnelle concentration en chlorophylle. L'intérêt pour la Chlorelle comme aliment a commencé à la fin des années quarante, époque à laquelle on craignait que la surpopulation ne mène à une crise alimentaire mondiale. De nombreuses recherches furent alors entreprises par des institutions aux États-Unis. Sa haute teneur en protéines la rendait potentiellement très intéressante. Elle contient en outre de nombreuses vitamines et acides gras essentiels. Tous ces espoirs furent finalement déçus, la Chlorelle s'avérant très onéreuse à produire. La révolution verte ayant été la solution aux problèmes de production alimentaire, elle perdit de son intérêt. Aujourd'hui, elle constitue un complément alimentaire vendu en magasin diététique. Elle possède de bonnes vertus détoxifiantes, de fixation des métaux lourds et immunostimulantes.

I.6.4. Production de molécules à haute valeur ajoutée

Dans ce cas, la micro-algue est cultivée pour un élément bien précis de sa composition. Parmi ces molécules on trouve : les pigments, les acides gras polyinsaturés, les polysaccharides et les substances bioactives.

I.6.4.1. Les pigments

Une des voies de valorisations intéressantes à partir de micro-algues est celle de la production de pigments (Figure I-24). Ces pigments peuvent servir dans le domaine alimentaire en tant que colorants ou encore dans le domaine de la pharmacutique en tant que pigments fluorescents. Les micro-algues renferment une grande variété de pigments dédiés à de nombreuses applications.







Chlorophylles		
	a – b	vert/bleu-vert
Phycobiliprotéines		
	Phycocérythrine	rose, rouge, violet
	Phycocyanine	bleu
	Allophycocyanine	bleu-vert
Caroténoïdes		
	α – β – γ carotène	jaune
	Xanthophylles (lutéine)	orange, brun-rouge

Figure I-24 : Différents pigments présents chez les micro-algues

- Les caroténoïdes

Les caroténoïdes constituent la famille de pigments la plus représentée chez les micro-algues. Ces pigments sont responsables de la couleur rouge-jaune-orange chez de nombreux organismes vivants. Les caroténoïdes jouent un rôle important dans la nutrition et la santé car plusieurs sont des provitamines A (précurseurs de la vitamine A). Les caroténoïdes ont également des propriétés antioxydantes, ce qui va avoir un effet positif sur la peau, le système immunitaire, cardio-vasculaire et pour la lutte contre le cancer. Beaucoup de pigments utilisés en industrie sont retrouvés chez les micro-algues comme : le β -carotène, l'astaxanthine, la lutéine, la zéaxanthine, etc....

Avec la demande croissante de molécules d'origine naturelle, et les prévisions de suppression de colorants de synthèse, le marché des caroténoïdes issus des micro-algues offre des perspectives commerciales élevées.

✓ *Le β -carotène*

Le β -carotène peut être obtenu soit par extraction, soit par synthèse ou par voie biotechnologique. Le β -carotène naturel provient principalement de l'huile de palme rouge et de la carotte. Cependant, plus de 90% du β -carotène commercial est d'origine synthétique (León et al., 2003). Le β -carotène (E160a) est utilisé dans le domaine alimentaire comme colorant pour la préparation de la margarine, pour les produits de boulangerie, les boissons gazeuses et les sucreries. Il peut être utilisé comme provitamine A en tant que complément vitaminé. En alimentation animale, il est utilisé pour les aliments du poisson et du bétail. Dans l'alimentation des poulets, le β -carotène améliore la couleur des jaunes d'oeufs et l'apparence de la chair. Dans le domaine pharmaceutique, il est incorporé à certaines crèmes solaires en raison de ses propriétés d'agent filtrant contre le soleil et anti-radicaux libres. La micro-algue la plus riche en β -carotène est *Dunaliella salina* qui peut accumuler jusqu'à 14% de son poids sec en β -carotène (Ben-Amotz, 1993). Elle est cultivée majoritairement en Australie sur un site de 800 ha exploités par BASF/Cognis (Figure I-25).



Figure I-25 : *Dunaliella salina* dans la lagune Hutt en Australie (BASF/Cognis)

✓ *L'astaxanthine*

Sur le marché actuel, l'astaxanthine est principalement extrait d'une micro-algue, *Haematococcus pluvialis*. Ce pigment est naturellement présent chez les crustacés (crabes, crevettes, homard, écrevisses, langoustes), le saumon et la daurade rose. Cet antioxydant très puissant peut être utilisé comme complément alimentaire chez l'homme, l'animal et l'élevage de poissons pour la coloration des saumons ou des truites.

✓ *La lutéine*

La lutéine est traditionnellement extraite de pétales de rose d'Inde (*Tagetes erecta*). La lutéine se rencontre chez certaines micro-algues marines comme *Dunaliella salina*, *Muriellopsis* et *Scenedesmus almerensis* à hauteur de 0,6%.

- Les phycobiliprotéines

Les propriétés colorantes et fluorescentes de la phycoérythrine (rouge) et de la phycocyanine (bleue) sont exploitées pour le diagnostic en recherche et médecine et en industrie alimentaire. Ces phycobiliprotéines sont synthétisées par les Cyanobactéries (Spiruline) et certaines micro-algues rouges (*Porphyridium. cruentum*) dont la production commerciale est assurée en conditions très contrôlées dans des photobioréacteurs. La phycocyanine, extraite de la Spiruline, est un pigment bleu utilisé dans les industries cosmétiques et alimentaires, sous le nom de Linablue (Morice et Jamma, 1992). Hautement purifiée, elle possède des propriétés de fluorescence qui la rende utilisable dans des tests d'immuno-diagnostique.

I.6.4.2. Lipides et Acides gras polyinsaturés

Les micro-algues ont un avantage sur les espèces oléagineuses terrestres : elles peuvent accumuler jusqu'à 80% de leur poids sec en acides gras, permettant d'envisager des rendements à l'hectare supérieurs aux espèces oléagineuses terrestres.

Parmi tous les acides gras présents dans leur composition, certains ont un intérêt spécifique : l'acide γ -linoléique GLA (18 :3, *cis* 6, 9, 12), l'acide arachidonique AA (20 :4 *cis* 5, 8, 11, 14), l'acide eicosapentaénoïque EPA (20 :5 *cis* 5, 8, 11 14, 17) et

l'acide docosahexaénoïque DHA (22 :6 *cis* 4, 7, 10, 13, 16, 19) (Certik and Shimizu, 1999). Ces acides gras sont dit essentiels car ils ne peuvent pas être synthétisés par notre organisme. Ils sont apportés grâce à notre alimentation. Ils ont une influence particulière sur la structure des membranes des cellules et sur l'équilibre des réactions physiologiques dans l'organisme. Le cœur et le cerveau ont besoin de DHA pour fonctionner de manière optimale. Actuellement, ces acides gras essentiels sont majoritairement produits à partir des huiles de poissons. Avec la raréfaction des ressources en poissons, la production d'acides gras essentiels à partir d'une autre source pourrait constituer une alternative intéressante. Par ailleurs, ces molécules extraites de micro-algues procurent un goût plus agréable, une meilleure digestibilité et moins d'odeur.

Quelques espèces de micro-algues comme *Nannochloropsis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium*, *Nitzschia laevis*, *Mortierelle*, *Pythiturn* et *Parietochloris incisa* présentent un taux élevé d'EPA dans leur huiles entre 7 et 50 % (Certik and Shimizu, 1999; Khozin-Goldberg et al., 2006).

Les phospholipides constituent également une opportunité de valorisation intéressante des micro-algues. Présents dans tous les organismes, ils participent à des fonctions cellulaires diverses. Ce sont des vecteurs d'acides gras ou des principes actifs grâce à leur double polarité (hydrophobe et hydrophile). Ils sont utilisés par ailleurs comme bio-surfactant ou émulsifiant en agroalimentaire.

I.6.4.3. Polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères solubles dans l'eau, qui ont des propriétés rhéologiques intéressantes particulièrement utiles dans l'industrie alimentaire pour gélifier certains liquides, en cosmétique pour épaissir des crèmes. Certaines espèces de micro-algues comme *Porphyridium purpureum* et *Arthrospira platensis*, synthétisent des exopolysaccharides de nature hydrophile et polyanionique (Becker, 2004), capables de retenir l'eau et piéger les cations empêchant la dessiccation de la cellule. Ces propriétés de concentration ont suggéré des applications biotechnologiques dans le domaine de l'environnement via la détoxification de milieux pollués par les métaux lourds (Pb, As, Hg, Cd.) ou dans le domaine de la biorécupération de métaux comme l'or et l'uranium.

I.6.4.4. Substances bioactives

Un grand nombre de substances ayant une activité biologique intéressante ont été trouvés dans l'environnement marin. Des tests réalisés *in vitro* montrent des activités antibiotiques chez certaines micro-algues. Une activité antivirale a été révélée chez les Cyanobactéries principalement dans un produit extracellulaire chez *Arthrospira platensis* contre le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1), le virus de l'herpès simplex 1 et le virus de l'herpès humain type 6 (HHV-6) (Ayehunie et al., 1998; Hernández-Corona et al., 2002). Chez *Porphyridium purpureum*, des essais *in vitro* sur les exopolysaccharides (EPS) montrent une activité antivirale contre le cytomégalovirus humain (HCMV) (Rechter et al., 2006). La micro-algue *Porphyridium purpureum* produit également, des superoxydes dismutases (SOD), substances à activité antiradicalaire utilisées dans le traitement de pathologies chroniques comme le SIDA et certaines formes de cancers (Gorecki et al., 1991). Des soins cosmétiques anti-âges sont aussi fabriqués en utilisant des propriétés antiradicalaires d'origine micro-algale.

I.6.5. Applications environnementales

I.6.5.1. Traitement des eaux usées

Les micro-algues sont capables d'assimiler de nombreux nutriments nécessaires à leur croissance, elles peuvent donc éliminer certains éléments présents dans les eaux usées. Elles permettent ainsi de baisser les taux de phosphates et nitrates. Elles ont une action détoxifiante et dépolluante et peuvent agir selon deux modes : soit directement grâce à leur capacité à fixer les métaux lourds, soit indirectement afin de fournir de l'oxygène dissous aux bactéries permettant la dépollution des eaux contaminées (Figure I-26). Des travaux ont déjà été menés sur l'élimination des métaux lourds présents dans les eaux usées (Perales-Vela et al., 2006) et sur la dégradation de contaminants toxiques comme le tributylétain « TBT » par *Chlorella vulgaris* (Luan et al., 2006).



Figure I-26 : Traitement des eaux usées par les micro-algues (“Algae Control « Thrive Water – Alternative Wastewater Treatment Solutions,»”)

I.6.5.2. Remédiation du CO₂

Un des principaux avantages de la culture des micro-algues réside sur la capacité de la photosynthèse à absorber le CO₂, qui est ensuite converti en biomasse, lipides, ou bioproduits précieux. Le CO₂ émis par les centrales thermiques, les industries de la sidérurgie, cimenterie, pétrochimie ou tout autre secteur peut donc être utilisé pour la culture industrielle des micro-algues. Cela permet d'obtenir à la fois la réduction des émissions de gaz à effet de serre, la production de combustibles au bilan carbone neutre et des bioproduits valorisables.

Un démonstrateur a été réalisé en Israël par Seambiotic où les fumées sortant de la centrale électrique au charbon d’Ashkelon sont directement injectées dans la culture (Herman Weiss, 2008).

I.6.6. Applications en bio-énergie

Les micro-algues peuvent être une source d’énergie non négligeable. Comme toute biomasse, celles-ci peuvent produire du biogaz par méthanisation. Certaines micro-algues sont riches en sucre et peuvent produire alors du bioéthanol. D’autres riches en lipides permettront la production de biodiesel. Parmi ces différents scénarios, la production de biogaz et de biodiesel sembleraient être les plus pertinentes.

I.6.6.1. Le biodiesel

Nous avons vu que, cultivées dans des conditions dites « de stress », certaines espèces de micro-algues peuvent accumuler des taux importants de lipides et plus spécifiquement des triglycérides. Ces derniers par réaction de transestérification avec un alcool conduisent à des esters utilisables dans les moteurs à combustion.

La production de biodiesel à partir de micro-algues a pris une ampleur mondiale suite au premier choc pétrolier dans les années 70.

Dans le courant des années 90, le prix du pétrole relativement bas conduit à un fort ralentissement des programmes R&D.

Au début des années 2000, devant l'augmentation du prix des carburants et face à une pénurie du pétrole, la production d'algo-carburant revient à l'ordre du jour.

En plus de l'argument de productivité, les micro-algues possèdent un atout majeur par rapport aux autres solutions : la non-concurrence avec les cultures alimentaires (Figure I-27).

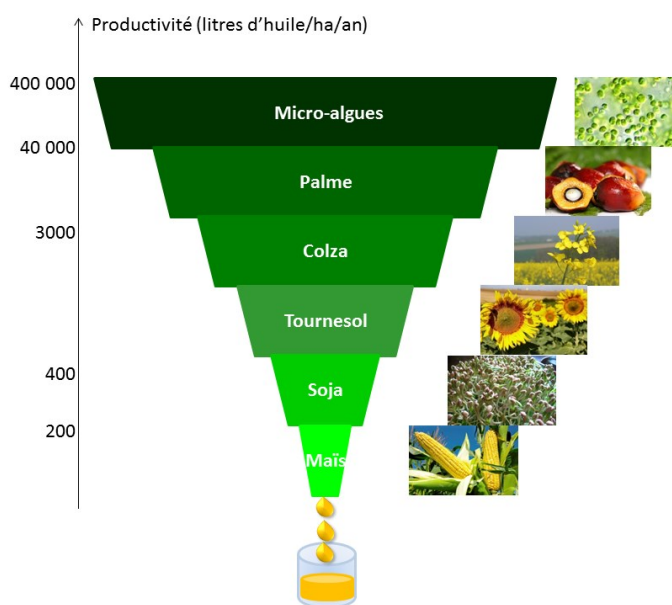


Figure I-27 : Productivité en huile des micro-algues par rapport à d'autres plantes oléagineuses

I.6.6.2. Le bioéthanol

Généralement, l'éthanol est produit à partir de matière première riche en sucre ou en amidon. Certaines micro-algues disposent d'une paroi cellulaire composée de polysaccharides et d'autres peuvent contenir jusqu'à 50% d'amidon. Elles peuvent donc être utilisées comme matière première dans le processus de production d'éthanol. Les micro-algues ont le net avantage de ne pas contenir de lignine et d'avoir des polysaccharides plus facilement décomposables que la biomasse ligneuse. Des micro-algues comme *Chlamydomonas perigranulata* ou *Chlorella vulgaris* peuvent aisément donner lieu à une production d'éthanol ou d'autres alcools grâce à l'auto-fermentation de leur amidon. La production et le stockage de l'amidon et de sucre dans une micro-

algue s'effectue au moment de la photosynthèse ou en la nourrissant directement de sucres. Après fermentation anaérobie dans l'obscurité, la production d'éthanol s'opère. Ce procédé a déjà fait l'objet d'études dans des photobioréacteurs fermés utilisant de l'eau de mer avec des Cyanobactéries OGM métaboliquement améliorées.

I.6.6.3. Le biohydrogène

Le bio-hydrogène est une source efficace d'énergie renouvelable qui suscite actuellement de nombreuses recherches. Il n'est ni toxique, ni polluant, plus énergétique que le pétrole et abondant. En revanche, les techniques de production disponibles à ce jour comme par exemple l'électrolyse de l'eau, la gazéification ou la pyrolyse de la biomasse disposent de coûts de production élevés. Depuis plusieurs années, les micro-algues et les bactéries ont été étudiées à cette fin. Hans Gaffron en 1939 fut à l'origine de cette voie de production de l'hydrogène. Certaines micro-algues produisent de l'hydrogène lors de la photosynthèse. Le problème majeur de cette technique est l'arrêt de cette production d'hydrogène lorsque les cellules retrouvent des conditions de cultures favorables sans anoxie. Plusieurs travaux ont été menés à ce sujet, l'espèce *Chlamydomonas reinhardtii* reste la plus utilisée (Melis and Happe, 2001).

I.6.6.4. Le biométhane

Une forme différente d'énergie peut également être produite à partir de micro-algues, le biométhane. Celle-ci se révèle particulièrement adaptée à cette application. Après fermentation dans un digesteur, elles génèrent un biogaz composé de 70% de méthane, les autres gaz étant du dioxyde de carbone et de l'azote. Cette technologie a été développée dans les années 40 aux États-Unis et est maintenant répandue. Le grand avantage de la méthanisation est que la biomasse n'a pas besoin d'être séchée alors que pour de nombreuses voies de valorisation de la biomasse, une étape de séchage est requise.

Cette bibliographie exhaustive a donné lieu à la rédaction d'une review dans la revue OCL : « Les micro-organismes comme sources de lipides pour les biocarburants de troisième génération. »

OCL 2013, 20(6) 607

© M. ABERT VIAN *et al.*, Published by EDP Sciences 2013

DOI: 10.1051/ocl/2013032



REVIEW – DOSSIER

OPEN ACCESS

MICRO-ORGANISMS PRODUCTEURS DE LIPIDES

Les micro-organismes comme sources de lipides pour les biocarburants de troisième génération

Maryline ABERT VIAN, Céline DEJOYE TANZI et Farid CHEMAT^a

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, INRA, UMR 408, GREEN Extraction Team, 84000 Avignon, France

Reçu le 24 juin 2013 – Accepté le 22 juillet 2013

Résumé – Cette revue propose un panorama complet des connaissances actuelles sur les microorganismes sources de lipides utilisés comme biocarburant. Elle fournit les éléments nécessaires à la compréhension de la culture des microorganismes (micro-algues, levures, bactéries et champignons) et de leur capacité à accumuler les lipides. Des techniques conventionnelles et innovantes ainsi que des solvants alternatifs pour extraire les lipides ont été détaillés.

Mots clés : Lipides / microorganismes / levures / champignons / bactéries / micro-algues / culture / extraction

Abstract – Microorganisms as sources of lipids. This review presents a complete picture of current knowledge on microorganisms as sources of lipids used as bio fuel. It provides the necessary background about the culture of the microorganisms (microalgae, yeast, bacteria, and fungi) and their ability to accumulate lipids. Conventional and innovative techniques and alternative solvents for extraction of lipids from microorganisms have been detailed. A special focus has been done for lipids from microalgae.

Keywords: Lipids / microorganisms / yeast / fungi / bacteria / microalgae / culture / extraction

I.7. Conclusions et plan d'action

L'état des connaissances établi dans ce chapitre a permis de montrer que les micro-algues représentaient une source de biomasse et de biodiversité unique dans le monde vivant. Leur diversité est plus grande que toutes les plantes terrestres : on en trouve certaines riches en protéines, minéraux, vitamines, pigments ou lipides. Leurs performances «biologiques» et la variété des espèces prédisposent les micro-algues à se positionner dans la course aux énergies renouvelables et notamment vers la production de biodiesel.

Cependant de nombreux verrous sont à lever avant d'aboutir à une viabilité économique. Les verrous économiques sont déclinés au niveau technologique,

biologique, sociétal et environnemental. Parmi les verrous technologiques, l'extraction des algues demeure un verrou important à lever dans la chaîne de procédés.

Cet état de l'art a permis de mettre en évidence des lacunes dans le domaine de l'extraction des lipides de micro-algues. Les procédés d'extraction de lipides actuels requièrent d'une part l'usage de solvants pétrochimiques toxiques et d'autre part une consommation énergétique importante. En effet, le séchage de la biomasse entrante est quasi systématique préalablement à l'étape d'extraction, ce qui engendre un coût énergétique conséquent.

Face à ce constat, il apparaît nécessaire d'apporter des améliorations aux procédés actuels et de s'orienter vers des nouvelles techniques d'extraction.

Nous avons ainsi appréhendé cette problématique d'extraction des lipides de micro-algues selon la démarche suivante :

- (1) Etude de la faisabilité de substitution du n-hexane (solvant de choix pour l'extraction des lipides) par des solvants terpéniques avec un dispositif d'extraction existant (le Soxhlet) et une biomasse sèche (conventionnelle utilisée)
- (2) Mise au point d'une nouvelle technique d'extraction associant l'usage des solvants terpéniques (démontrés comme efficaces) et l'emploi de biomasse humide
- (3) Intensification de cette nouvelle technique d'extraction par les micro-ondes.

Références bibliographiques

A

Andrich, G., Nesti, U., Venturi, F., Zinnai, A., Fiorentini, R., **2005**. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis sp.* *European Journal of Lipid Science and Technology* 107, 381–386.

Ayehunie, S., Belay, A., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., **1998**. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). *J. Acquir. Immune*

B

Becker, E.W., **2007**. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25, 207–210.

Becker, W., **2004**. Microalgae in Human and Animal Nutrition, in: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. *Blackwell Publishing Ltd*, pp. 312–351.

Ben-Amotz, A., **1993**. Marine Biotechnology Volume 1: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products. *Springer*.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Cell Biology* 37, 911–917.

Borowitzka, M.A., **1995**. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appl Phycol* 7, 3–15.

Borowitzka, M.A., **1999**. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters, in: R. Osinga, J.T. (Ed.), *Progress in Industrial Microbiology*. Elsevier, pp. 313–321.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G., **1997**. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151, 315–331.

C

Canela, A.P.R.F., Rosa, P.T.V., Marques, M.O.M., Meireles, M.A.A., **2002**. Supercritical Fluid Extraction of Fatty Acids and Carotenoids from the Microalgae *Spirulina maxima*. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41, 3012–3018.

Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X., **2006**. Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol. Prog.* 22, 1490–1506.

Certik, M., Shimizu, S., **1999**. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 1–14.

Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., Chang, J.-S., **2011**. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102, 71–81.

Chen, M., Chen, X., Liu, T., Zhang, W., **2011**. Subcritical Ethanol Extraction of Lipid from Wet Microalgae Paste of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 5, 385–389.

Cheung, P.C., **1999**. Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chemistry* 65, 399–403.

Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R.W., Das, K.C., **2010**. Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology* 101, 3097–3105.

Chisti, Y., **2007**. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25, 294–306.

Chisti, Y., Moo-Young, M., **1986**. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology* 8, 194–204.

Cho, H.-S., Oh, Y.-K., Park, S.-C., Lee, J.-W., Park, J.-Y., **2013**. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 54, 156–160.

Crampon, C., Mouahid, A., Toudji, S.-A.A., Lépine, O., Badens, E., **2013**. Influence of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*. *The Journal of Supercritical Fluids* 79, 337–344.

D

Desmorieux, H., Decaen, N., **2005**. Convective drying of *spirulina* in thin layer. *Journal of Food Engineering* 66, 497–503.

E

Ehimen, E.A., Sun, Z., Carrington, G.C., **2012**. Use of Ultrasound and Co-Solvents to Improve the In-Situ Transesterification of Microalgae Biomass. *Procedia Environmental Sciences* 15, 47–55.

F

F. Soxhlet, **1879**. . *Dinglers' Polyt. J.* 232, 461.

Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Fernández, F.G.A., Moreno, P.A.G., Grima, E.M., **2007**. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 120–126.

G

G. E. Fogg, **1953**. The Metabolism of Algae.

George Wypych, **2001**. Handbook of Solvents.

Golmakani, M.-T., Mendiola, J.A., Rezaei, K., Ibáñez, E., **2012**. Expanded ethanol with CO₂ and pressurized ethyl lactate to obtain fractions enriched in γ -linolenic acid from *Arthrospira platensis* (*Spirulina*). *The Journal of Supercritical Fluids* 62, 109–115.

Gorecki, M., Beck, Y., Hartman, J.R., Fischer, M., Weiss, L., Tochner, Z., Slavin, S., Nimrod, A., **1991**. Recombinant human superoxide dismutases: production and potential therapeutical uses. *Free Radic. Res. Commun. 12-13 Pt 1*, 401–410.

Guderjan, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D., **2007**. Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 55–62.

Gupta, M.N., Batra, R., Tyagi, R., Sharma, A., **1997**. Polarity Index: The Guiding Solvent Parameter for Enzyme Stability in Aqueous-Organic Cosolvent Mixtures. *Biotechnology Progress* 13, 284–288.

H

Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A., **2011**. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresource Technology* 102, 178–185.

Hansen, C.M., **2008**. Polymer science applied to biological problems: Prediction of cytotoxic drug interactions with DNA. *European polymer journal* 44, 2741–2748.

Harrison, S.T., **1991**. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Adv.* 9, 217–240.

Hejazi, M.A., Wijffels, R.H., **2004**. Milking of microalgae. *Trends in Biotechnology* 22, 189–194.

Herman Weiss, **2008**. Method for growing photosynthetic organisms.

Hernández-Corona, A., Nieves, I., Meckes, M., Chamorro, G., Barron, B.L., **2002**. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antiviral Res.* 56, 279–285.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., **2006**. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* 98, 136–148.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., **2008**. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639.

K

Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., Pimenta-Leibowitz, M., Nechev, J., Zilberg, D., **2006**. Feeding with arachidonic acid-rich triacylglycerols from the microalga *Parietochloris incisa* improved recovery of guppies from infection with *Tetrahymena sp.* *Aquaculture* 255, 142–150.

Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M.H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-G., Lee, S.H., **2013**. Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy* 56, 99–103.

Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A., **2011**. Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology* 102, 4265–4269.

L

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., **2009**. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6475–6481.

Lee, J.-Y., Yoo, C., Jun, S.-Y., Ahn, C.-Y., Oh, H.-M., **2010**. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology* 101, S75–S77.

Lee, Kim, Kim, Kwon, Yoon, Oh, **1998**. Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus braunii*. *Letters in Applied Microbiology* 27, 14–18.

León, R., Martín, M., Vígara, J., Vilchez, C., Vega, J.M., **2003**. Microalgae mediated photoproduction of beta-carotene in aqueous-organic two phase systems. *Biomol. Eng.* 20, 177–182.

Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., Ohlrogge, J., **2006**. Oil content of Arabidopsis seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* 67, 904–915.

Liang, K., Zhang, Q., Cong, W., **2012**. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Lipid from Microalgae. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11771–11776.

Liu, Z.-Y., Wang, G.-C., Zhou, B.-C., **2008**. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 99, 4717–4722.

Luan, T.G., Jin, J., Chan, S.M.N., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., **2006**. Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry* 41, 1560–1565.

Lundquist, T., Woertz, I., Quinn, N., Benemann, J., **2010**. A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. *Energy Biosciences Institute* 1–178.

M

Mamidipally, P.K., Liu, S.X., **2004**. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 122–125.

Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S., **2010**. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 217–232.

Melis, A., Happe, T., **2001**. Hydrogen Production. Green Algae as a Source of Energy. *Plant Physiol.* 127, 740–748.

Mendes, R.L., Nobre, B.P., Cardoso, M.T., Pereira, A.P., Palavra, A.F., **2003**. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta* 356, 328–334.

Mendes, R.L., Reis, A.D., Palavra, A.F., **2006**. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira maxima* (*Spirulina*): Comparison with organic solvent extraction. *Food Chemistry* 99, 57–63.

Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., Señoráns, F.J., **2007**. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry* 102, 1357–1367.

Mercer, P., Armenta, R.E., **2011**. Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 539–547.

Metzger, P., Casadevall, E., Pouet, M.J., Pouet, Y., **1985**. Structures of some botryococenes: branched hydrocarbons from the b-race of the green alga *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 24, 2995–3002.

Michel Cavalla, **2000**. Les Algues, les micro-algues. URL
http://mcavalla.free.fr/rsr/Algues_operon.pdf

Mouahid, A., Crampon, C., Toudji, S.-A.A., Badens, E., **2013**. Supercritical CO₂ extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. *The Journal of Supercritical Fluids* 77, 7–16.

Muller-Feuga A., **2000**. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology* 12, 527–534.

N

Nagle, N., Lemke, P., **1990**. Production of methyl ester fuel from microalgae. *Appl Biochem Biotechnol* 24-25, 355–361.

P

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N., **2011**. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102, 35–42.

Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O., **2006**. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere* 64, 1–10.

Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., **2011**. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research* 45, 11–36.

Julie Person, Daniel Mathieu, Jean-François Sassi, Laura Lecurieux-Belfond, Robert Gandolfo, Catherine Boyen, Olivier Lépine, Jérémy Pruvost, Philippe Potin, Eric Deslandes, Pierre Chagvardieff, Antoine Findeling, Jack Legrand, Jean-Paul Cadoret, Olivier Bernard, **2011**. Algues, filières du futur, Adebitech. ed. Adebitech, Romainville.

Pulz, O., **2001**. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287–293.

Pulz, O., Gross, W., **2004**. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635–648.

R

Rangel-Yagui, C. de O., Danesi, E.D.G., de Carvalho, J.C.M., Sato, S., **2004**. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology* 92, 133–141.

Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V.S., **2010**. Mechanistic Assessment of Microalgal Lipid Extraction. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 2979–2985.

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F., **2011**. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88, 3411–3424.

Rechter, S., König, T., Auerochs, S., Thulke, S., Walter, H., Dörnenburg, H., Walter, C., Marschall, M., **2006**. Antiviral activity of *Arthrospira*-derived spirulan-like substances. *Antiviral Res.* 72, 197–206.

Robert, R., Chretiennot-Dinet, M.-J., Kaas, R., Martin-Jezequel, V., Moal, J., Le Coz, J.-R., Nicolas, J.-L., Bernard, E., Connan, J.-P., Le Dean, L., Le Gourriec, G., Leroy, B., Quere, C., **2004**. Amélioration des productions phytoplanctoniques en éclosion de mollusques : caractérisation des micro-algues fourrage.

S

Sado Guy, Sado M. C., **1991**. Les plans d'expériences: de l'expérimentation à l'assurance de qualité. AFNOR.

Sajilata, M.G., Singhal, R.S., Kamat, M.Y., **2008**. Supercritical CO₂ extraction of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 84, 321–326.

Sánchez Mirón, A., Contreras Gómez, A., García Camacho, F., Molina Grima, E., Chisti, Y., **1999**. Comparative evaluation of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology* 70, 249–270.

Snyder, L.R., **1978**. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *J Chromatogr Sci* 16, 223–234.

Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Converti, A., **2005**. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture* 243, 217–224.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., **2006**. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101, 87–96.

Subra, P., Boissinot, P., **1991**. Supercritical fluid extraction from a brown alga by stagewise pressure increase. *Journal of Chromatography A* 543, 413–424.

T

Temelli, F., **1992**. Extraction of Triglycerides and Phospholipids from Canola with Supercritical Carbon Dioxide and Ethanol. *Journal of Food Science* 57, 440–443.

Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S., **2010**. Pressurized hot water extraction (PHWE). *J Chromatogr A* 1217, 2484–2494.

Thana, P., Machmudah, S., Goto, M., Sasaki, M., Pavasant, P., Shotipruk, A., **2008**. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 99, 3110–3115.

U

Uauy, R., Valenzuela, A., **2000**. Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* 16, 680–684.

Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Hoadley, A.F.A., **2010**. Marine microalgae flocculation and focused beam reflectance measurement. *Chemical Engineering Journal* 162, 935–940.

V

Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F., **2008**. Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-hexane. *Chroma* 68, 311–313.

W

Walker, T.H., Cochran, H.D., Hulbert, G.J., **1999**. Supercritical carbon dioxide extraction of lipids from *Pythium irregulare*. *J Amer Oil Chem Soc* 76, 595–602.

Weissman, J.C., Goebel, R.P., Benemann, J.R., **1988**. Photobioreactor design: Mixing, carbon utilization, and oxygen accumulation. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 336–344.

Y

Yoo, G., Park, W.-K., Kim, C.-W., Choi, Y.-E., Yang, J.-W., **2012**. Direct lipid extraction from wet *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using osmotic shock. *Bioresource Technology*.

Z

Zbinden, M.D.A., Sturm, B.S.M., Nord, R.D., Carey, W.J., Moore, D., Shinogle, H., Stagg-Williams, S.M., **2013**. Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 1605–1615.

Chapitre II. Méthodologie expérimentale

II.1. Solvants et réactifs

Les différents solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations sont listés dans le tableau II-1:

Tableau II-1: Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations

Nom du produit	N° CAS	Fournisseur
Acétate de méthyle HPLC	79-20-9	VWR
Acide acétique	64-19-7	VWR
Acide <i>o</i> -phosphorique	7664-38-2	VWR
Acide sulfurique	7664-93-9	VWR
α -pinène	80-56-8	Sigma Aldrich
Chloroforme HPLC	67-66-3	VWR
Chlorure de sodium	7647-14-5	VWR
Chlorure de potassium	7447-40-7	VWR
Diéthyléther HPLC	60-29-7	VWR
<i>d</i> -limonène	5989-27-5	Sigma Aldrich
<i>n</i> -hexane GC	110-54-3	VWR
Isopropanol HPLC	67-63-0	VWR
Méthanol	67-56-1	VWR
Méthanol HPLC	67-56-1	VWR
<i>p</i> -cymène	99-87-6	Sigma Aldrich
Sulfate de cuivre	7758-99-8	VWR

II.2. Biomasse micro-algale

Les expérimentations ont été réalisées à partir de différentes espèces de micro-algues ; chacune d'elles disposent de caractéristiques morphologiques (constitution des membranes et parois) et de teneur en lipides différentes. Les cinq espèces concernées dans ces travaux sont *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina*.

II.2.1. *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris est une micro-algue verte, unicellulaire, eucaryote, se développant dans les eaux douces, dite micro-algue dulcicole. En taxonomie, elle fait partie de la classe des Chlorophytes. Cette algue sphérique mesure entre 2 et 8 μm et possède un noyau bien spécifique et une membrane cellulosique. Elle est constituée de 50 à 60% de

protéines, de nombreux minéraux (cuivre, fer, magnésium,...), d'acides gras dont certains oméga-3 et de pigments tels que la chlorophylle qui représente de 2 à 4% de son poids sec. La souche utilisée pour réaliser ces travaux nous a été fournie par Alphabiotec (Asserac, France). Cette souche a été cultivée en raceway sans conditions particulières de carence. La biomasse a été récoltée par filtration membranaire, centrifugée afin d'obtenir une "pâte algale" à 20% de matière sèche puis lyophilisée.

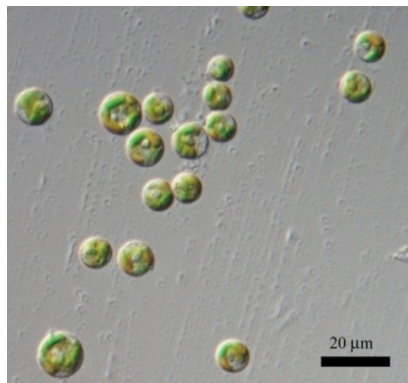


Figure II-1 : Photographie de *Chlorella vulgaris* (<http://ccala.butbn.cas.cz>)

II.2.2. *Nannochloropsis oculata*

Nannochloropsis oculata est une micro-algue brune, qui se développe dans des milieux à faible salinité. Elle appartient à la classe des Eustigmatophycées. Ce sont des micro-algues planctoniques, avec une structure très simple et de très petites tailles, de l'ordre de 1 à 2 µm. Cette micro-algue est composée en grande partie d'EPA (écosapentaénoïque C20:5), un acide gras essentiel au métabolisme, et de pigment tels que la chlorophylle, l'astaxanthine, la zéaxanthine et la canthaxanthine. Elle possède une prédisposition à stocker facilement les lipides et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés ; c'est pourquoi elle est considérée comme une micro-algue prometteuse pour une application en bioénergie. La souche utilisée pour réaliser ces travaux nous a été fournie par Greensea (Mèze, France). *Nannochloropsis oculata* a été cultivée dans des réacteurs tubulaires sous conditions de carence afin d'obtenir une teneur en lipides satisfaisante. La biomasse a été récoltée, centrifugée afin d'obtenir une "pâte algale" à 17.2% de matière sèche puis congelée à -20°C.

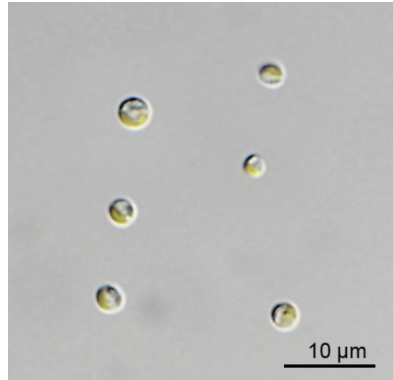


Figure II-2 : Photographie de *Nannochloropsis oculata* (<http://cfb.unh.edu>)

II.2.3. *Dunaliella salina*

II.2.3.1. Souche issue de salins naturels

Dunaliella salina est une micro-algue verte, appartenant à la classe des Chlorophycées, qui se développe spontanément et préférentiellement dans les milieux lagunaires très salés ; c'est une micro-algue halophile. Elle est connue pour ses fortes activités anti-oxydantes grâce à son métabolisme qui lui permet de stocker de fortes quantités de caroténoïdes. Peu d'organismes sont capables de survivre dans des conditions avec de telles concentrations de sel. Pour survivre, *Dunaliella salina* produit des quantités élevées en β -carotène qui lui permet de se protéger de l'intensité lumineuse mais également des hautes concentrations en glycérol qui lui confère une protection contre les chocs osmotiques. La souche utilisée pour réaliser nos travaux nous a été fournie par Greensea (Mèze, France); c'est une souche dite « sauvage » qui a été récoltée directement dans son milieu naturel (marais salant). Ce milieu de culture lui a permis de se développer dans des conditions extrêmes de fort ensoleillement et de concentrations en sel de l'ordre de 150 g/l. Elle a été récoltée, centrifugée afin d'obtenir une "pâte algale" à 20% de matière sèche puis congelée à -20°C .

II.2.3.2. Souche du site de Gruissan

Une autre souche de l'espèce *Dunaliella salina* a été utilisée pour réaliser nos travaux. Cette souche a été produite dans le cadre du projet Salinalgue sur le site de Gruissan (Aude). Cette biomasse a été cultivée dans des photo-bioréacteurs "de type poche" sans

conditions particulièrement de carence. La biomasse a été récoltée, centrifugée afin d'obtenir une "pâte algale" à 30% de matière sèche puis congelée à -20°C.

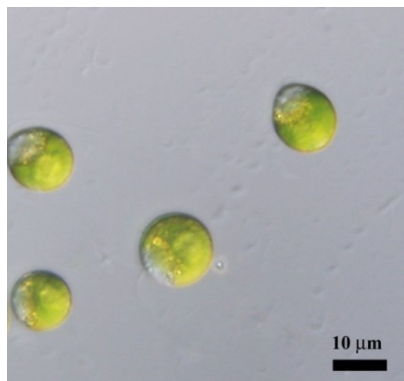


Figure II-3 : Photographie de *Dunaliella salina* (<http://ccala.butbn.cas.cz>)

II.3. Procédés d'extraction des lipides de micro-algues

II.3.1. Extraction conventionnelle selon Bligh and Dyer (lipides totaux)

Les extractions dites conventionnelles de référence sont réalisées à partir de la méthode de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). 100 mg de biomasse micro-algale à 20% de matière sèche et un mélange de 3 ml de méthanol:chloroforme (2 :1) est ajouté puis agité pendant 10 min. 1 ml de chloroforme et 0.8 ml de chlorure de potassium à 0.8% sont ajoutés au mélange puis agité une seconde fois pendant 10 min. La mixture est ensuite centrifugée à 4000 rpm (rotation par minute) pendant 5 min à 4°C. La phase inférieure est isolée puis analysée directement en chromatographie sur couche mince haute performance (High Performance Thin Layer Chromatography HPTLC) et en Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

II.3.2. Extraction par le n-hexane et solvants alternatifs

Les lipides sont extraits des micro-algues grâce à une procédure standard de Soxhlet (F. Soxhlet, 1879). 10.0g de biomasse sèche sont pesées et mis dans une cartouche en cellulose de 30 mm x 80 mm (Macherey-Nagel). Le dispositif de Soxhlet est surmonté d'un réfrigérant est positionné sur un ballon de distillation de 500 ml contenant 300 ml

de solvant (Figure II-6). Après 8h de chauffage à reflux (ISO 659-1988), le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est séché puis pesé. L'évaporation des solvants terpéniques est réalisée grâce à une distillation azéotropique. Dans ce cas, la verrerie Soxhlet est remplacée par une verrerie Clevenger comme le montre la Figure II-7. De l'eau distillée est ajoutée au mélange terpènes/lipides puis l'ensemble est chauffé. Le solvant terpénique est entraîné avec l'eau et recondensé dans le système de récupération qui les sépare par simple différence de densité. Les lipides sont, quant à eux, isolés dans le ballon.

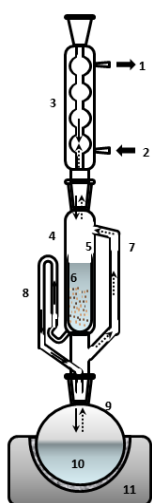


Figure II-4 : Représentation schématique du Soxhlet (1 : Sortie d'eau, 2 : Entrée d'eau, 3 : Réfrigérant, 4 : Soxhlet, 5 : Chambre du Soxhlet, 6 : Cartouche, 7 : Système de distillation, 8 : Siphon, 9 : Ballon, 10 : Solvant, 11 : Chauffe ballon)

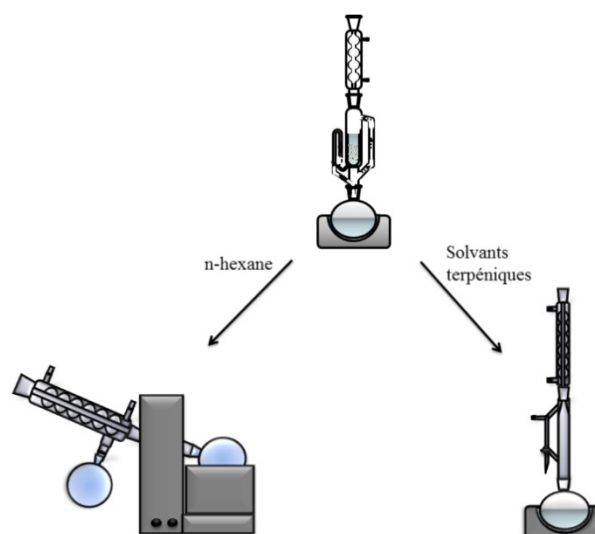


Figure II-5 : Procédure d'élimination du solvant

II.3.3. Extraction à partir de biomasse humide à l'aide de solvants alternatifs (Simultaneous Distillation and Extraction Process, SDEP)

12g de "pâte" algale (20% de MS) est introduite dans un ballon de 500 ml avec 100 ml de solvant terpénique (d-limonène, α -pinène ou p-cymène). Le ballon est surmonté d'une verrerie de type Dean Stark modifiée muni d'un robinet trois voies permettant de recueillir les condensats (Figure II-8).

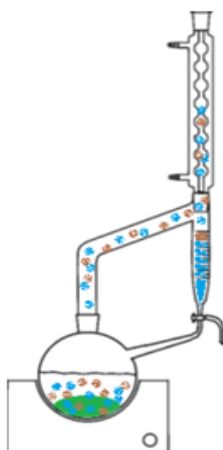


Figure II-6: Schéma du Dean Stark modifié

Cette méthode d'extraction se déroule selon 3 étapes (Figure II-9).

L'étape 1 consiste à éliminer par distillation l'eau intrinsèque de la biomasse. Cette étape permet de favoriser l'extraction des lipides avec le solvant terpénique. L'eau distillée est ainsi recueillie par le système trois voies.

L'étape 2 correspond à la phase d'extraction à proprement dite où le mélange biomasse/solvant terpénique est chauffé pendant 30 min.

L'étape 3 consiste enfin à réintroduire l'eau "isolée" de l'étape 1 afin d'éliminer le solvant terpénique par entraînement azéotropique (déjà décrit dans le I.3.2, Clevenger) (étape 4).

L'extrait lipidique présent dans le ballon est séché sous vide et stocké à -20°C pour analyses.

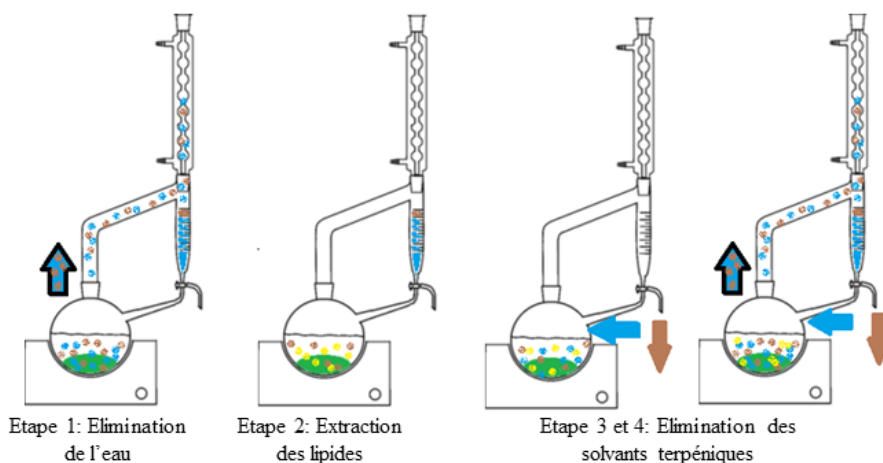


Figure II-7: Schéma descriptif du SDEP (vert: pâte algale, bleu: eau de la pâte algale et marron: solvant terpénique)

II.3.4. Intensification du SDEP par micro-ondes (SDEP/MO)

Le principe du procédé d'extraction SDEP assisté par micro-ondes (SDEP/MO) est représenté sur la Figure II-8. Un four micro-ondes de laboratoire, (Ethos, Milestone) de puissance maximale 1000 W et de fréquence 2,45V GHz, a été utilisé pour ces travaux. La puissance micro-ondes et la durée d'extraction sont modulables. La température est suivie grâce à une sonde infrarouge interne à la cavité du four.

Pour cette méthode, le chauffage conventionnel par convection (SDEP) a été substitué par un chauffage par micro-ondes ; l'expérience se déroule selon le protocole décrit au II.3.3.

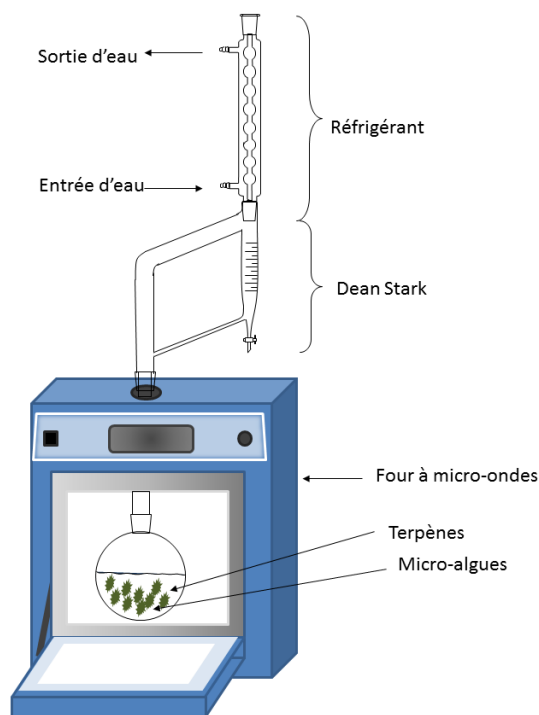


Figure II-8: Schéma du SDEP/MO

II.4. Méthodes analytiques

II.4.1. Analyses physico-chimiques

II.4.1.1. Détermination de la teneur en matière sèche

La détermination de la teneur en matière sèche (MS) des "pâtes" algales humides a été réalisée grâce à un humidimètre OHAUS MB45. Cet appareillage fonctionne grâce au principe de thermogravimétrie qui consiste à mesurer la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température, la température fixée était de 110°C jusqu'à obtention d'une masse constante. Une fois, le poids stable atteint, le séchage est terminé et le résultat affiché indique le pourcentage d'humidité présent dans la matrice et le poids final de l'échantillon.

Le calcul de la matière sèche de la pâte algale a été réalisé comme suit :

$$MS\% = 100 - MH\%$$

où MS%: pourcentage de matière sèche

MH%: pourcentage d'humidité donné par l'humidimètre

II.4.1.2. Détermination de la teneur en matière organique et de la teneur en sels minéraux

La détermination de la teneur en matière organique et en sels minéraux de la biomasse est réalisée par calcination. Les échantillons sont placés dans des creusets en porcelaine, puis introduits dans un four pendant 2h à 550°C. La teneur en matière organique (MO%) a été calculée de la façon suivante:

$$mMO = mMT - mcendres$$

$$MO\% = \frac{mMO}{mMT} \times 100$$

où mMO : masse de matière organique (g)

mMT : masse de biomasse (g) introduite dans le creuset avant calcination

m_{cendres} : masse des cendres contenues dans le creuset à la fin de la calcination

(g)

MO% : pourcentage de matière organique

Le calcul de la teneur en sels minéraux est réalisé comme suit:

$$m_{sel} = m_{MT} - m_{MO}$$

$$Sel\% = \frac{m_{sel}}{m_{MT}} \times 100$$

où m_{sel} : masse des cendres présentes dans le creuset (g)

Sel% : pourcentage de sel contenu dans la pâte algale

II.4.2. Analyse des extraits lipidiques

II.4.2.1. Détermination de la composition en acides gras par CPG-FID

- Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique de séparation des substances chimiques qui repose sur des différences de comportement de séparation entre une phase mobile courante et une phase stationnaire pour séparer les composants d'un mélange. Si les conditions d'équilibre thermodynamique sont remplies de façon idéale, les molécules du soluté se dispersent de façon gaussienne et leur distribution à la sortie de la colonne peut être figurée par une courbe de Gauss, qui est un pic spécifique à chaque élément à analyser du fait de temps de rétention spécifique dans la colonne en fonction de leur affinité pour celle-ci.

Cette méthode permet donc l'analyse de la composition des lipides en acides gras après transformation de ces derniers en esters méthyliques d'acides gras et permet la détermination exacte de la composition des lipides par comparaison avec des standards. Dans un premier temps, les esters méthylique d'acides gras (EMAG) sont séparés et identifiés grâce à un chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur de

spectrophotométrie de masse (CG-SM). Les EMAG sont ensuite quantifiés grâce à un chromatographe en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CG-FID)

- Mode opératoire

Les EMAG ont été obtenus par réaction de transméthylation selon la méthode décrite par Li et al. modifiée (Li et al., 2006). L'extrait lipidique est solubilisé dans une solution d'H₂SO₄ méthanolique (5%). Puis, le mélange est chauffé pendant 90 min à 85°C dans un bain à sec (Fischer Bioblock Scientific, Illkirch, France). La solution est ensuite refroidie puis 1,5 ml de solution de chlorure de sodium (0,9%) et 1 ml de n-hexane sont ajoutés. Le mélange est agité pendant 30 sec puis centrifugé à 4000 rpm pendant 2 min. L'appareillage utilisé pour l'analyse des esters méthyliques d'acides gras est un chromatographe en phase gaz Agilent (Kyoto, Japon) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire BD-EN14103 30 m x 320 µm x 0,25 µm (Agilent).

La séparation des EMAG a été réalisée selon la méthode suivante : la colonne étant à la température initiale de 50°C pendant une minute, la montée en température a lieu à raison de 2°C/min jusqu'à une température de 180°C puis de 180°C à 220°C à raison de 2°C/min pour y rester 10 min. Le logiciel EasyChromElite (Kyoto, Japon) est utilisé pour l'intégration des chromatogrammes obtenus. Les acides gras sont alors identifiés par comparaison avec le temps de rétention d'étalons appropriés (Sigma Co, USA). Pour calculer le rendement lipidique, les EMAG sont quantifiés grâce à l'étalon interne, le glycéryl triheptadecanoate (C17:0 TAG), dans un premier temps en µg d'EMAG/ml d'extrait, puis dans un second temps, cette concentration est calculée en µg d'EMAG/g de matière sèche et enfin pour 100 g de matière sèche.

II.4.2.1. Analyse des classes de lipides par HPTLC

La chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) a été mise en œuvre afin de détecter les différentes classes de lipides (polaires et apolaires) présents dans les extraits lipidiques des micro-algues en fonction des différentes méthodes d'extraction. L'utilisation de l'HPTLC étant peu répandue, cette méthode sera détaillée en raison de son originalité.

- Principe

Cet appareillage développé par la société CAMAG (Switzerland) est basé sur le principe d'une détection par densitométrie effectuée à la suite d'une chromatographie sur couche mince. Elle permet de séparer, d'identifier et de quantifier des échantillons de quelques picogrammes. L'HPTLC est une méthode chromatographique qui permet de séparer les différents composés d'un extrait. Elle peut être considérée comme l'évolution de la chromatographie sur couche mince (CCM) en permettant une séparation et une analyse qualitative et quantitative des extraits. Le support chromatographique est une plaque de verre recouverte de phase SiO₂ à fine granulométrie: 3-5µm. Les plaques peuvent contenir jusqu'à 25 échantillons ce qui permet une bonne répétabilité des résultats par la multiplication des dépôts souhaités et ceci lors d'une même expérimentation. La plaque de silice sur laquelle sont déposés les extraits représente la phase stationnaire sur laquelle vont se séparer les composés du mélange grâce aux éluants. Les quatre modules sont présentés sur la Figure II-11.

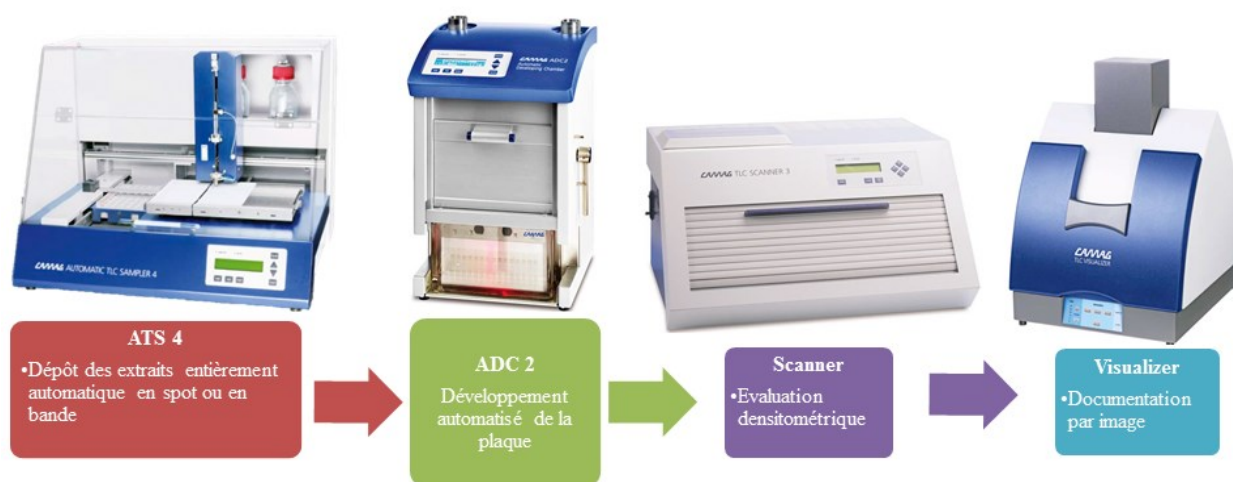


Figure II-9 : Les différents modules de l'HPTLC

- Mode opératoire

Les extraits sont déposés grâce au déposeur automatique ATS 4 (CAMAG, Switzerland) en "spray bande" en utilisant l'azote comme gaz vecteur du dépôt sur des plaques de silice 20 x 10 cm, gel 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Les plaques de

silice HPTLC sont développées dans le développeur automatique ADC 2 (CAMAG, Switzerland) avec deux éluants différents. Une double migration a été effectuée pour permettre dans un premier temps la séparation des lipides polaires ; lyso-phosphotidylcholine LPC, phosphatidylcholine PC, phosphatidyléthanolamine PE puis dans un second temps, la séparation des lipides neutres ; monoacylglycérol MAG, diacylglycérol DAG, acides gras libres AGL et triacylglycérol TAG. Le premier éluant est une solution d'acétate de méthyle/isopropanol/chloroforme/méthanol/chlorure de potassium (0.25% en solution dans l'eau distillée) dans un ratio de 25/25/25/10/9 v/v/v/v/v, l'élution est réalisé jusqu'à 5,5 cm de la plaque. Le second éluant est une solution de n-hexane/diéthyléther/acide acétique glaciale dans des ratios de 80/20/2 v/v/v, cette élution est réalisée jusqu'à 8,5 cm. Les classes de lipides sont détectées par révélation à l'acide. Après séchage, la plaque de silice a été plongée pendant 6 sec dans un réactif de sulfate de cuivre modifié (20 g CuSO₄, 200 ml méthanol, 8 ml H₂SO₄ et 8 ml H₃PO₄) puis chauffée à 141°C pendant 30 min sur un chauffe plaque TLC. Après dérivatisation, la plaque est finalement scannée en utilisant le scanner densiomètre 3 TLC (CAMAG, Muttenz, Switzerland), l'identification et la quantification des différentes classes de lipides sont réalisables grâce à la présence d'étalons. Les résultats sont traités grâce au logiciel WinCATs (CAMAG). Les données du densitomètre sont reportées comme valeurs et sont exprimées en pourcentages relatifs ou en mg d'une classe de lipides par g de matière sèche.

Chapitre III. Les solvants alternatifs pour l'extraction de lipides de micro-algues sèches

∅ Céline Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Christian Ginies, Mohamed Elmaataoui, Farid Chemat

"Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae"

2012. *Molecules* 17, 8196-8205

Ce chapitre III porte sur l'extraction de la fraction lipidique de micro-algues sèches par des solvants alternatifs de type terpénique en substitution au solvant pétrochimique, le n-hexane. Ce travail exposera un aspect innovant appliqué à une technique conventionnelle d'extraction des lipides, le Soxhlet.

III.1. Introduction

III.1.1. L'Extraction Solide-Liquide

Une grande diversité de technologies et de dispositifs ont été développés et sont utilisés dans le domaine de l'extraction solide-liquide. Le processus d'extraction dans une matrice donnée est de manière générale équivalent quel que soit l'appareillage utilisé. Il se divise en quatre étapes de transfert de masse, illustré par la Figure III.1. Dans un premier temps, le solvant pénètre à l'intérieur de la matrice où des interactions entre le solvant et la surface de la matrice vont avoir lieu (1). Cette première étape sera suivie d'une étape de diffusion du solvant dans la matrice en vue de la solubilisation de l'analyte cible et de la formation du complexe solvant-analyte (2 et 3). L'analyte est enfin transporté à l'extérieur de la surface de la matrice vers le solvant environnant (4 et 5) (Emile Béliard and Pierre Mafart, 2004). Ainsi, l'extraction consiste à solubiliser et à détacher l'analyte souhaité de sa matrice dans un temps raisonnable et en proportion satisfaisante. Cependant, le processus peut parfois s'avérer difficile et fortement dépendant de la complexité et de la géométrie de la matrice. Dans les opérations d'extraction par solvant, le choix du solvant et de ses propriétés vis-à-vis des molécules ciblées (capacité de mise en solution, polarité, sélectivité) est un paramètre essentiel. De plus, de nombreuses forces, interactions et relations physico-chimiques peuvent ralentir ces différentes étapes (forces de dispersion, diffusion interstitielle, interactions chimiques...) (Kislik, 2012).

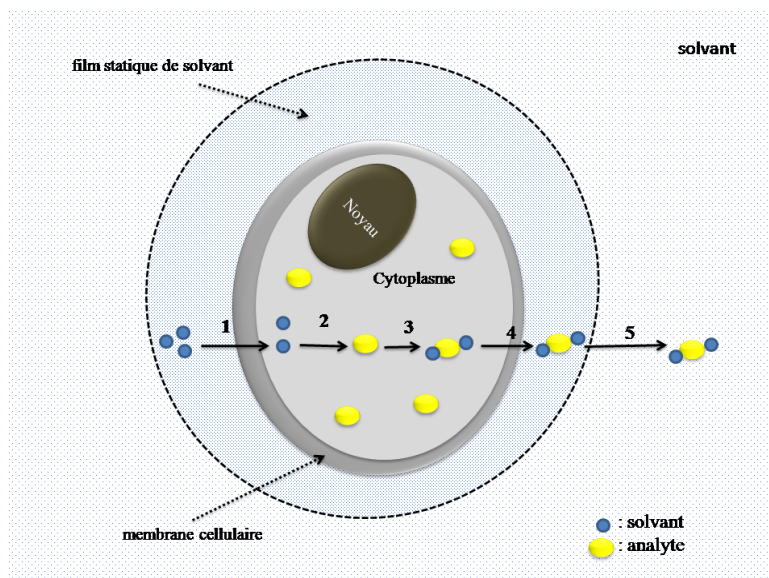


Figure III-1 : Processus d'extraction solide-liquide dans une cellule

III.1.2. Solvants organiques vs Solvants alternatifs

Dans le secteur de l'extraction de substances naturelles, l'extraction par solvant organique volatil reste la méthode la plus pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont le n-hexane, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Les solvants sont, en effet, des substances très efficaces qui dissolvent les solutés solides et liquides, et leur volatilité facilite leur élimination en fin de procédé. Cependant, les solvants organiques, sont aussi, pour bon nombre d'entre eux, inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes, etc.). De nombreux travaux ont déjà été réalisés sur ces effets nocifs (Baldasseroni et al., 2003; Manini et al., 2004). De ce fait, leur utilisation est de plus en plus souvent montrée du doigt pour sa participation à la pollution environnementale et à l'effet de serre. Par ailleurs, l'épuisement progressif des ressources pétrolières et surtout le durcissement de la réglementation obligent les industriels du secteur à s'orienter vers des solutions alternatives plus respectueuses de l'environnement (Herrero et al., 2006; Liang et al., 2012; Mouahid et al., 2013; Virot et al., 2008).

Un solvant d'extraction est caractérisé par différentes propriétés ; il doit être un liquide volatil, simple ou mixte, qui a la propriété de dissoudre des substances spécifiques (pouvoir solvant) sans altérer ces dernières. Dans une démarche d'éco-extraction, un solvant « vert », en référence à la chimie verte, ne doit pas être seulement efficace mais doit aussi posséder, des caractéristiques complémentaires liées à la

sécurité et à l'impact environnemental (Anastas and Warner, 2000). Comme illustré dans la Figure III-2, le solvant "idéal" de remplacement doit comporter plusieurs avantages et notamment; être non COV, faiblement toxique, avoir un faible impact sur l'environnement (non CMR, biodégradable), être non inflammable, avoir un coût réduit, être issu de ressources renouvelables et non pétrochimiques, disposer d'un fort pouvoir solvant et être facile à récupérer (évaporation/élimination).

De nombreux exemples de solvants tentent de répondre à ces différentes exigences comme notamment les agrosolvants. Parmi les différents agrosolvants disponibles sur le marché, les terpènes présentent d'intéressantes propriétés physico-chimiques pour l'extraction des huiles en raison de leur caractère apolaire et leur faible poids moléculaire.

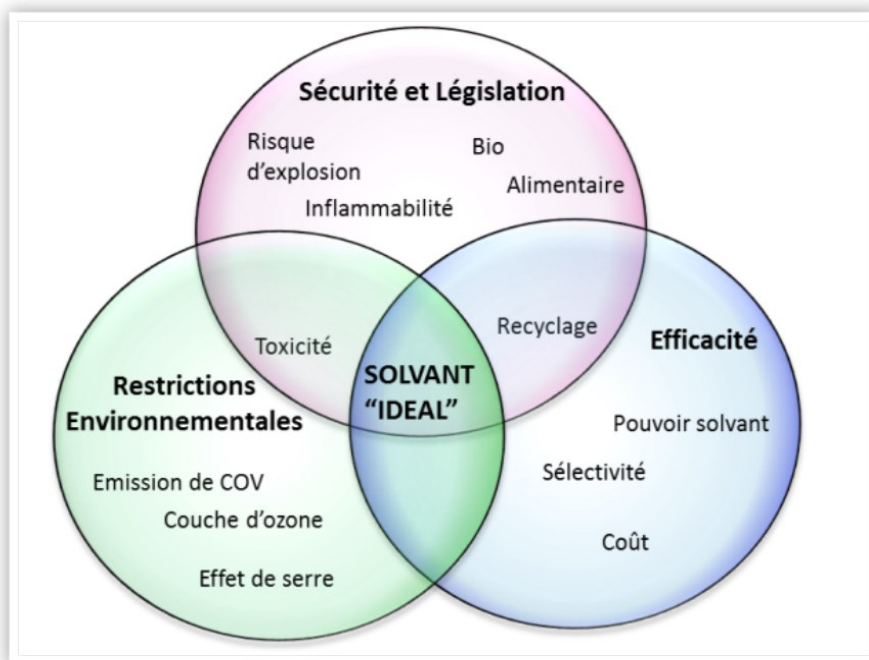






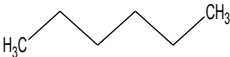
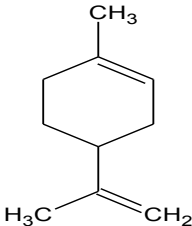
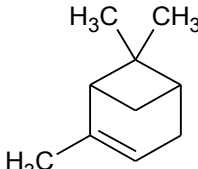
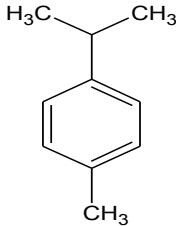
Figure III-2: Le solvant "idéal"

III.1.3. Les agrosolvants terpéniques

Le d-limonène, l' α -pinène et le p-cymène, les solvants terpéniques d'étude employés dans ce chapitre, sont des coproduits majeurs de l'industrie papetière, des agrumes et des résidus forestier. Comme illustré dans le Tableau III-1, le d-limonène, l' α -pinène et le p-cymène sont des molécules mono-terpéniques.

Ces solvants sont issus de ressources renouvelables et représentent donc un axe de recherche à part entière dans le domaine de la valorisation des co-produits. Grâce à leurs propriétés physiques et/ou chimiques, ils peuvent jouer un rôle important dans le domaine de l'extraction. Les propriétés physico-chimiques les plus pertinentes de ces trois solvants sont comparées à celles du n-hexane dans le Tableau III-1.

Tableau III-1: Les propriétés physico-chimiques du n-hexane et des solvants terpéniques

	n-hexane	d-limonène	α -pinène	p-cymène
				
Structure chimique				
Poids moléculaire (g/mol)	100,21	136,24	136,24	134,22
Température d'ébullition (°C)	69	176	154	176
Point éclair (°C)	-23	48,3	32	47,2
Enthalpie de vaporisation (kJ/mol)	29,74	39,49	37,43	39,34
Paramètres d'Hansen δ (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})	7,3	8	7,9	8,1

L'intérêt pour les molécules terpéniques est apparu en 1995 avec le d-limonène lorsque ses propriétés nettoyantes et dégraissantes ont été mises en évidence par l'équipe de Toplisek T. et Gustafson R., (1995). Cette molécule a ainsi pu être désignée comme une alternative efficace pour le remplacement des hydrates de carbones halogénés utilisés dans les produits dégraissants conventionnels de l'industrie des produits ménagers (Toplisek T. and Gustafson R., 1995). Par ailleurs, de nombreux travaux dans le domaine de l'extraction ont été publiés, et notamment l'extraction d'huile végétale (son de riz et olive) par le d-limonène, en vue de son application à l'échelle industrielle (Mamidipally and Liu, 2004; Virot et al., 2008).

Compte tenu de l'état de l'art relatif à l'extraction de lipides de micro-algues, il existe aujourd'hui une réelle demande d'un procédé d'extraction solide-liquide simple, innovant et respectueux de l'environnement. Ce chapitre relate une première étude consistant à utiliser une technique conventionnelle d'extraction, le Soxhlet en substituant le n-hexane par des solvants terpéniques pour isoler les lipides de micro-algues sèches.

III.2. Les terpènes comme solvants alternatifs pour l'extraction de lipides de micro-algues

III.2.1. Résumé de l'article

L'article "Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae" a été publié dans "*Molecules*" en 2012 (Vol 17, p 8196-8205).

L'objectif de cette étude a été de montrer la capacité des solvants terpéniques à extraire les lipides de micro-algues sur une biomasse sèche (lyophilisée) en utilisant une méthode conventionnelle d'extraction des lipides, le Soxhlet (ISO 659-1988, International Organization for Standardization (ISO), 1988).

La température d'ébullition du n-hexane (69°C), sa polarité et son pouvoir solvant vis-à-vis des lipides font qu'il est le solvant de choix pour l'extraction des lipides et notamment des triglycérides dans le domaine des oléagineux. Néanmoins, le n-hexane est un dérivé du pétrole, qui reste dangereux pour l'environnement, et pour la personne qui le manipule (neurotoxique, effets sur la reproduction, génotoxique et cancérogène). Ce travail vise à substituer le n-hexane par les solvants terpéniques suivants: d-limonène, α -pinène ou p-cymène. La substitution du n-hexane par un solvant alternatif est possible si ce dernier remplit plusieurs conditions. Il doit être capable d'extraire efficacement les lipides, être issu de ressources renouvelables, peu coûteux, facilement éliminable et respectueux de l'environnement et de la santé humaine. Les solvants utilisés sont issus de ressources renouvelables: les peaux d'orange pour le d-limonène, les résidus de bois pour l' α -pinène et les déchets de l'industrie papetière pour le p-cymène (Tableau III-1). Peu d'études ont encore été réalisées sur ces trois solvants afin de connaître leur impact sur la santé humaine (INRS, 2012). Le procédé d'extraction utilisé est le procédé d'extraction traditionnel du Soxhlet représenté sur la Figure III- 3. Le solide est placé dans une cartouche poreuse. Le solvant, contenu dans le ballon, est

porté à ébullition, ce qui le transfère, dans la partie supérieure. Là, il est condensé grâce à un réfrigérant situé en haut de l'installation et s'accumule autour et à l'intérieur de la cartouche. Lorsque le solvant atteint le niveau supérieur du siphon, le mélange est renvoyé dans le ballon par différence de pression, où il est à nouveau évaporé. Plusieurs cycles d'extraction sont ainsi effectués, la durée de l'opération est fixée à 8h selon la norme (ISO 659-1988, International Organization for Standardization (ISO), 1988). On considère avoir alors atteint l'épuisement total en soluté du substrat solide et avoir concentré l'extrait.

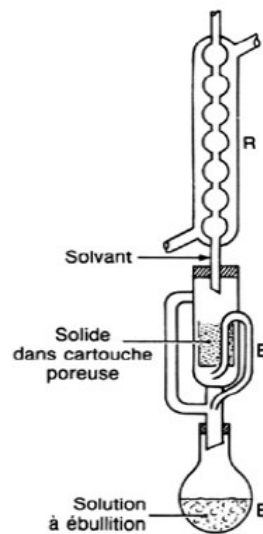


Figure III-3 : Schéma du Soxhlet (source : Tech. de l'Ing.) R : Réfrigérant, E : Extracteur, B : Ballon

L'efficacité de l'extraction Soxhlet va dépendre de plusieurs paramètres:

- (1) le taux de diffusion des lipides dans le solvant
- (2) la granulométrie de la matrice
- (3) la température
- (4) la durée du traitement

- (1) Le taux de diffusion va dépendre de l'affinité des lipides vis-à-vis du solvant utilisé et en partie de la vitesse de diffusion du composé cible vers le solvant qui à son tour va dépendre du poids moléculaire de ce composé. La viscosité du solvant et les caractéristiques membranaires de la matrice vont également avoir une incidence sur l'efficacité de l'extraction.

- (2) La granulométrie aura un impact au niveau de la vitesse de diffusion. Le solvant aura une vitesse de pénétration dans la matrice beaucoup plus rapide en présence de fines particules.
- (3) La température est le paramètre essentiel et le plus impactant sur le taux de récupération des lipides. La température de fonctionnement du Soxhlet est en général la température d'ébullition du solvant sauf si on désire travailler à une pression différente de la pression atmosphérique. A température plus élevée, la diffusion des composés cibles sera plus rapide car la viscosité du solvant sera beaucoup plus basse et pourra plus facilement pénétrer à l'intérieur de la cellule. Les solvants terpéniques utilisés possèdent une température d'ébullition élevée comprise entre 150 et 170°C.

(4) La durée de traitement a également un impact sur l'efficacité de la technique. Dans cette étude nous nous sommes référés à la norme Soxhlet (8h) (ISO 659-1988, International Organization for Standardization (ISO), 1988).

Des prélèvements au cours du temps ont permis d'établir des cinétiques d'extractions des lipides extraits. La micro-algue testée est *Chlorella vulgaris*, une micro-algue verte et dulcicole appartenant à la famille des Chlorophycées. Le schéma III-3 détaille la démarche expérimentale suivie dans ce travail. Afin de valider le potentiel de l'extraction des lipides marins par les solvants alternatifs, cette dernière a été comparée à l'extraction Soxhlet au n-hexane et à une méthode de référence pour l'extraction des lipides totaux à partir de biomasse marine, la méthode de Bligh and Dyer (méthanol/chloroforme) (Bligh and Dyer, 1959).

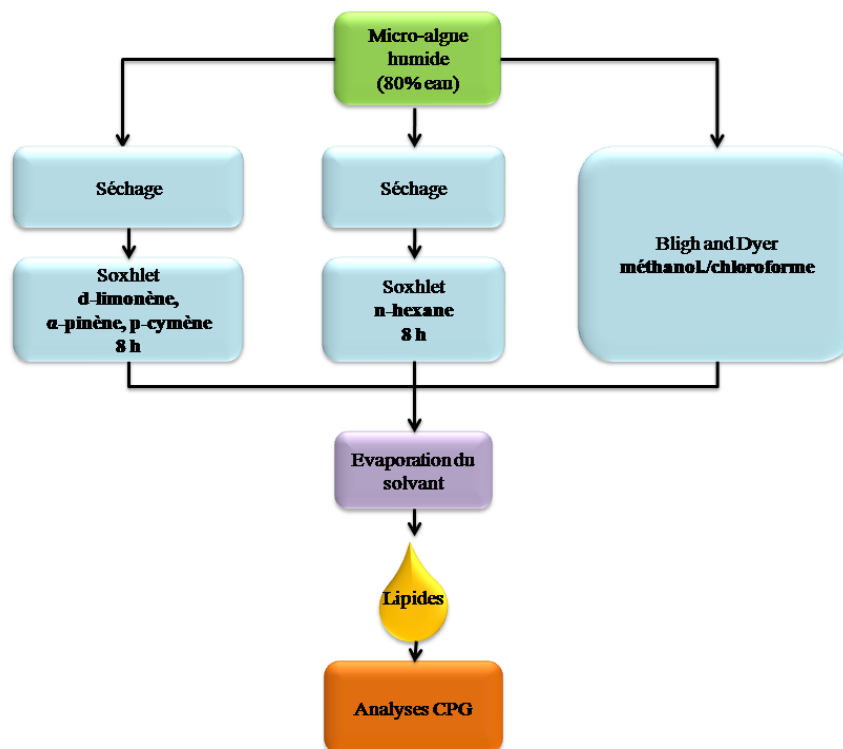


Figure III-4 : Démarche expérimentale de l'article : « Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae »

Dans un premier temps, les résultats obtenus ont montré l'efficacité des solvants terpéniques pour l'extraction des lipides marins. En effet, les rendements lipidiques obtenus avec les trois solvants terpéniques sont en moyenne de 1,24 % (g de lipides totaux pour 100g de biomasse sèche) contre 0,8% pour le n-hexane. En revanche, la méthode de Bligh and Dyer permet d'obtenir un taux de lipides de l'ordre de 3,3 %. Cette différence peut s'expliquer selon la sélectivité du solvant, le séchage de la biomasse et enfin la température d'extraction.

Le Soxhlet conventionnel utilise du n-hexane ce qui implique une sélection au niveau des lipides extraits à la différence du Bligh and Dyer qui utilise un mélange binaire méthanol/chloroforme (polaire et apolaire). L'apolarité du n-hexane va l'amener à solubiliser préférentiellement les lipides neutres. De par leur structure chimique, les solvants terpéniques sont quant à eux plus polaire que le n-hexane. Ainsi, ils peuvent solubiliser également certains lipides membranaires de type phospho ou glycolipides en plus des lipides neutres.

En outre, l'extraction Soxhlet requiert une étape de séchage (lyophilisation dans notre cas) de la biomasse ce qui a pour conséquence de provoquer un "aplatissement" des cellules limitant ainsi le transfert du solvant vers l'intérieur de la cellule. La même

tendance est observée avec les trois solvants terpéniques ; les rendements lipidiques restent inférieurs au rendement obtenu avec l'extraction par Bligh and Dyer mais similaires voir supérieurs à celui obtenu avec l'extraction par Soxhlet conventionnel (n-hexane). Toutefois, les observations microscopiques ont montré quelques cellules avec une paroi endommagée et un système pariétal beaucoup plus "clair" pour les extractions Soxhlet en comparaison à la biomasse sèche non traitée. Ceci montre donc que le contenu cellulaire a été "vidé" puis solubilisé dans le solvant environnant. Cependant, ces observations microscopiques ont également montré que l'extraction n'a pas été optimale sur l'ensemble des cellules. Ainsi, l'extraction par Soxhlet peut donc être attribuée en majeure partie à un phénomène de lessivage sur des cellules précédemment endommagées.

Les fortes températures pendant l'extraction Soxhlet ont pu également induire une dégradation thermique des lipides. A la différence du Bligh and Dyer qui ne demande aucun chauffage pendant la phase d'extraction des lipides. Comme il a été montré dans la littérature, les lipides peuvent subir une dégradation thermique à des températures avoisinant les 150°C (Dobarganes and Márquez Ruiz, 1998; Gornay, 2006).

En effet, les profils d'acides gras des extrais lipidiques montrent une dégradation thermique notamment au niveau de certains acides gras polyinsaturés plus sensibles à ce type de dégradation comme le C16:3, le C16:4 ou le C18:3. En revanche, les compositions en acides gras des extraits obtenus pour le n-hexane et les terpènes n'ont pas été fortement modifiées et les profils sont assez semblables.

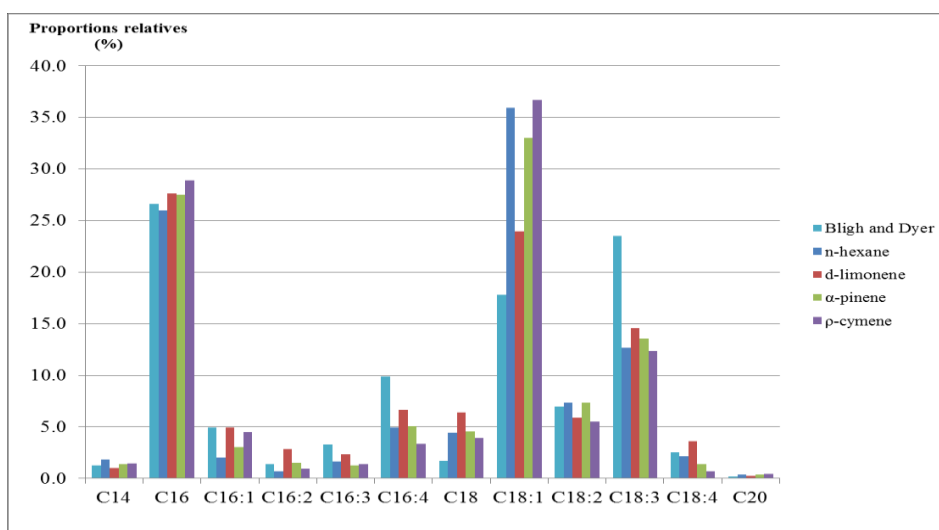


Figure III-5: Profil d'acides gras des extraits lipidiques

Enfin, afin d'évaluer l'avancement de l'extraction des lipides, le rendement lipidique a été suivi pour chaque extraction. Le suivi cinétique des extractions par Soxhlet conventionnel et terpéniques ont montré de fortes similitudes. Dans les deux cas, trois phases se dégagent des cinétiques.

La première phase correspond au temps de chauffage du solvant et au remplissage du premier siphon. La seconde est la période pendant laquelle les lipides vont être "extraits" puis solubilisés dans le solvant. Cette deuxième phase est très similaire: dans les deux cas après 7h30 d'extraction, nous avons pu observer des rendements lipidiques de 1,24 et 0,8 % respectivement pour les terpènes et le n-hexane. Cela signifie donc que le phénomène de lessivage s'effectue de la même manière (temporellement) pour le n-hexane ou pour les solvants terpéniques. Et enfin la troisième phase correspond à la fin de l'extraction où l'ensemble des lipides ont été extraits de la matrice et un palier apparaît pour le n-hexane et les solvants terpéniques.

Ainsi, cette première étude a permis de montrer la capacité des solvants terpéniques à extraire les lipides marins. Cependant, il semblerait que le procédé d'extraction par Soxhlet soit peu adapté à la biomasse algale; le séchage de la biomasse apparaît comme une étape limitante tant au niveau du processus de diffusion qu'au niveau énergétique. Ainsi, l'extraction s'effectue uniquement sur un processus de lessivage de la matrice et non pas de diffusion à l'intérieur des cellules ce qui a eu pour effet de réduire significativement les rendements. En revanche, les solvants terpéniques utilisés se sont montrés de bons candidats pour l'extraction des lipides marins compte tenu des résultats obtenus avec le n-hexane. Il semble donc nécessaire pour la suite de l'étude de s'affranchir de cette étape de séchage de la biomasse et de valider ces résultats sur une autre espèce de micro-algue plus riche en lipides.

III.2.2. Article

Molecules **2012**, *17*, 8196-8205; doi:10.3390/molecules17078196

OPEN ACCESS

molecules
ISSN 1420-3049
www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae

Celine Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian *, Christian Ginies, Mohamed Elmaataoui and Farid Chemat

Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, INRA, UMR408, UMR406, 84000 Avignon, France;
E-Mails: celine.dejoye@univ-avignon.fr (C.D.T.); christian.ginies@avignon.inra.fr (C.G.);
mohamed.elmaataoui@univ-avignon.fr (M.E.); farid.chemat@univ-avignon.fr (F.C.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: maryline.vian@univ-avignon.fr;
Tel.: +33-490-144-432; Fax: +33-490-144-441.

Received: 1 June 2012; in revised form: 21 June 2012 / Accepted: 26 June 2012 /
Published: 9 July 2012

Abstract: Here is described a green and original alternative procedure for extraction of oil from microalgae. Extractions were carried out using terpenes as alternative solvents from renewable feedstocks instead of hazardous petroleum solvents such as *n-hexane*. The described method is achieved in two steps using Soxhlet extraction followed by the elimination of the solvent from the medium using Clevenger distillation in the second step. Oils extracted from microalgae were compared in terms of qualitative and quantitative determination. No significant difference was obtained between each extract allowing us to conclude that the proposed method is green, clean and efficient.

Keywords: Lipid Extraction; Terpene solvent; *Chlorella vulgaris*; Soxhlet; Microalgae

1. Introduction

Extraction of oils from microalgae is a much more difficult problem than extraction of oils from oilseed. Microalgae are single-cell organisms with extremely tough cell walls that can be difficult to disrupt (Sheehan et al., 1998). The most common techniques for lipid extraction from microalgae in current use involve chloroform/methanol mixtures

or n-hexane in solvent or Soxhlet extraction. These flammable and toxic organic solvents cause adverse health and environmental effects.

Currently, n-hexane, derived from petroleum, is the solvent of choice for extraction of oils. Its chemical properties provide ideal functionalities as extraction solvent for oils. n-hexane is a light paraffinic petroleum fraction, has a fairly narrow boiling point range of 69°C and is an excellent solvent in terms of oil solubility and ease of recovery. However, this solvent can be emitted during extraction and recovery and has been identified as an air pollutant since it can react with other pollutants to produce ozone and photochemical oxidants (Hanmoungjai et al., 2000; Wan et al., 1995). Safety, environmental and health concerns have increased the interest in alternative solvents to n-hexane in order to reduce emissions of volatile organic compounds in the atmosphere. Due to the new drive in the environment protection and the development of the green chemistry, such solvent use to be avoided as much as possible. The green chemistry is based on twelve principles (Anastas and Warner, 2000) such as “design less hazardous chemical syntheses” (use substances with little or no toxicity to humans and the environment) or “use safer solvents and reaction conditions” (avoid using solvents). The twelve principles provide a good basis for researchers who want to develop new, more environmentally acceptable experiments. The most feasible alternative to n-hexane as solvent for extraction seems to be the replacement of this solvent by bio-solvent recognized as environmentally safer such as terpenes. In this study d-limonene, alpha-pinene and para-cymene were used in order to replace n-hexane.


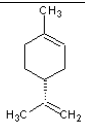
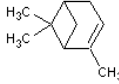
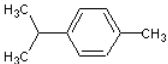
Terpenes are natural solvents existing both in the citrus fruits and in many other plants, with extraordinary technical and chemical properties. They include hydrocarbon with isoprene formula C_5H_8 and are derivable chiefly from essential oils, resins, and other vegetable aromatic products. Many terpenes are acyclic, bicyclic, or monocyclic, and differ somewhat in physical properties. They represent an optimal alternative to petroleum solvents in many industrial applications. d-limonene is a low cost, low toxicity biodegradable terpene present in agricultural wastes derived from citrus peels. As such this reagent can be considered as an economical renewable feedstock. It's a very versatile chemical which can be used in a wide variety of applications. The growing interest of limonene has emerged since its cleaner and degreaser qualities were recognized and taken into consideration (Toplisek T. and Gustafson R., 1995).

Recently, as an alternative to organic solvent extraction, the extraction of oil from oil-containing materials with d-limonene has been investigated (Liu and Mamidipally, 2005; Mamidipally and Liu, 2004; Virost et al., 2008b). The yield and quality of crude oil obtained from the d-limonene extraction were almost similar to those obtained using n-hexane. alpha-pinene is a natural terpene hydrocarbon obtained from Gum Turpentine, a kind of essential oil distilled from pine gum. Gum Turpentine, a renewable resource, has become a very important material as a solvent which is used to thin oil based paints and for producing varnishes. In Pine Forest, it started from gum turpentine to produce high quality alpha-pinene, beta-pinene, pine oil, terpineol and other terpenes. p-cymene is an aromatic hydrocarbon that occurs widely in tree leaf oils (Mitsuyoshi Yatagaia, et al., 1985). It's an important product and valuable intermediate in the chemical industry. Among others, it is used as a solvent for dyes and varnishes, as a heat transfer medium, as an additive in fragrances and musk perfumes, and as a masking odor for industrial products. To our knowledge, it is the first time that terpenes were used as solvent in extraction processes from oil-containing materials such as microalgae.

The relevant properties of those three terpenes as compared to n-hexane as solvent are listed in Table 1. Terpenes have similar molecular weights and structures to substitute n-hexane. Solubility parameters of solvents have been studied by means of Hansen Solubility Parameters (HSP) (Charles M. Hansen, 1999). HSP were developed by Charles M. Hansen and provide a way to describe a solvent in terms of its non-polar, polar, and hydrogen bonding characteristics. The HSPs work on the idea of "like dissolves like" where one molecule is defined as being 'like' another if it bonds to itself in a similar way. The overall behavior of a solvent is characterized by three HSP parameters: δ_d , the energy from dispersion bonds between molecules, δ_p , the energy from dipolar intermolecular force between molecules and δ_h , the energy from hydrogen bonds between molecules. n-hexane and terpenes have similar values of the three descriptive terms; they likely behave similarly in practice. From this point of view, the terpenes are as effective as n-hexane to dissolve oils. However, by considering dielectric constant terpenes are slightly more polar and more dissociating power than n-hexane. For the security point of view, terpenes have higher flash points than n-hexane, so they are less flammables and hazardous. The major drawback of using terpenes is their high viscosity and density, and also the higher energy consumption related to solvent

recovery by evaporation due to their high boiling point (155°C and 176°C) and high enthalpies of vaporization (37-39 kJ/mol) compared to n-hexane (Bp = 69 °C, ΔH_{vap} = 29.74 kJ/mol).

Table 1. Relevant properties of n-hexane and terpenes

Solvent	<i>n</i> -hexane	<i>d</i> -Limonene	α -Pinene	ρ -Cymene
Chemical Structure				
Molecular formula	C ₆ H ₁₄	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₆	C ₁₀ H ₁₄
Molecular weight (g.mol ⁻¹)	86.18	136.23	136.24	134.22
Density 25°C (g.cm ⁻³)	0.675	0.834	0.879	0.861
Flash point (°C)	-23	48.3	32	47.2
Boiling point (°C)	69	176	155	176
Viscosity, 25°C (Cp)	0.31	0.83	1.32	0.83
Enthalpy of vaporization (kJ.mol ⁻¹)	29.74	39.49	37.83	39.34
Surface tension, 25°C (dyne.cm ⁻¹)	20.3	25.8	25.3	28.5
Dielectric constant, 20°C	1.87	2.44	2.58	2.34
Hansen Solubility Parameters δ^a (cal ^{1/2} cm ^{-3/2})	7.3	8	7.9	8.1
δ_d	7.3	8	7.6	8.1
δ_p	0	0.1	2.1	0.3
δ_h	0	0.1	0	0

In order to resolve this problem of evaporation (energy and temperature), it is important to know how these bio-solvents have been extracted from the plant matrix. Terpenes are the primary constituents of the essential oils of many types of plants and flowers which are commonly extracted from their matrix by using water hetero-azeotropic distillation. Clevenger apparatus has been used for decades in hydrodistillation in order to extract and measure essential oils contained in plants (Albuquerque et al., 2007). This process allows the extraction of compounds at low temperature, about 97-98°C at atmospheric pressure and less if reduced pressure is applied, as compared to the high boiling point of terpenes contained in essential oils (150 to 300°C). Based on this fact this way can be used for the recovery of terpenes such as d-limonene, alpha-pinene and para-cymene, resulting from the extraction step of oil from microalgae (Fig. 1).

The aim of the study was to evaluate the possible extraction of oils from microalgae using terpenes as alternative solvent to n-hexane. Extraction step of oils from microalgae was thus investigated using the Soxhlet extraction and elimination step of

the solvent from the medium was carried out by using the Clevenger distillation. Extracted oils were then compared with oils obtained n-hexane in term of crude extract (quantitative results) and fatty acid composition (qualitative comparison).

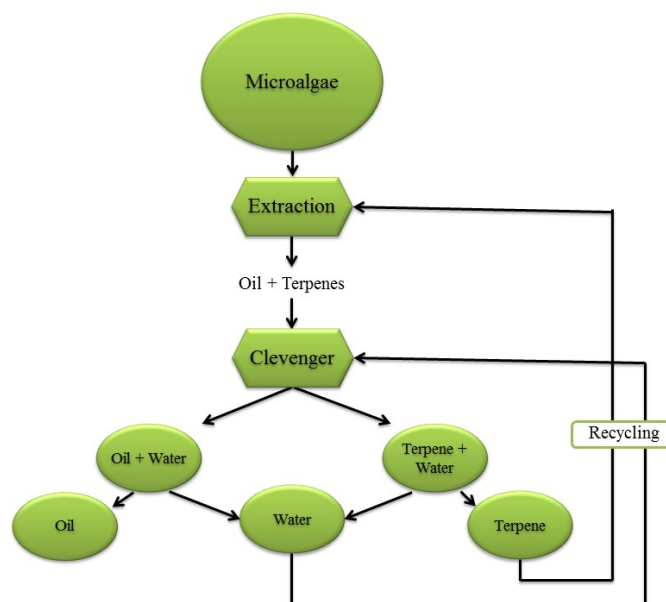


Figure 1. Extraction procedure using terpenes solvents

2. Results and Discussion

Soxhlet is recognized by the Association of Analytical Chemists (AOAC) as the standard method for crude fat analysis. Fat is extracted through repeated washing, or percolation, with an organic solvent under reflux in special glassware. Lipid extraction by soxhlet is usually performed with apolar solvents such as n-hexane. Since n-hexane is considered to be a hazardous air pollutant, interest in alternatives to n-hexane as an extraction solvent has been stimulated. As can be seen in this figure, n-hexane has been substituted by alternative solvent from renewable feedstocks such as d-limonene, alpha-pinene and para-cymene.

2.1. Extraction kinetics

The variations of the extraction yields according to the extraction time are shown in Fig. 2. The yields of oil extracted from microalgae with two different solvent are respectively 0.88% and 0.91% for n-hexane and alpha-pinene (d-limonene and para-

cymene give the same trends). As is shown in Fig. 2, kinetic profile and extraction rate for both solvents were similar. Three phases are observed: Step 1 represents the heating phase from room temperature to the boiling point of the solvent, Step 2 is represented by an increasing line which characterizes the diffusion of the oil from microalgae towards the external medium, and Step 3 corresponds to a horizontal line which marks the end of the extraction process.

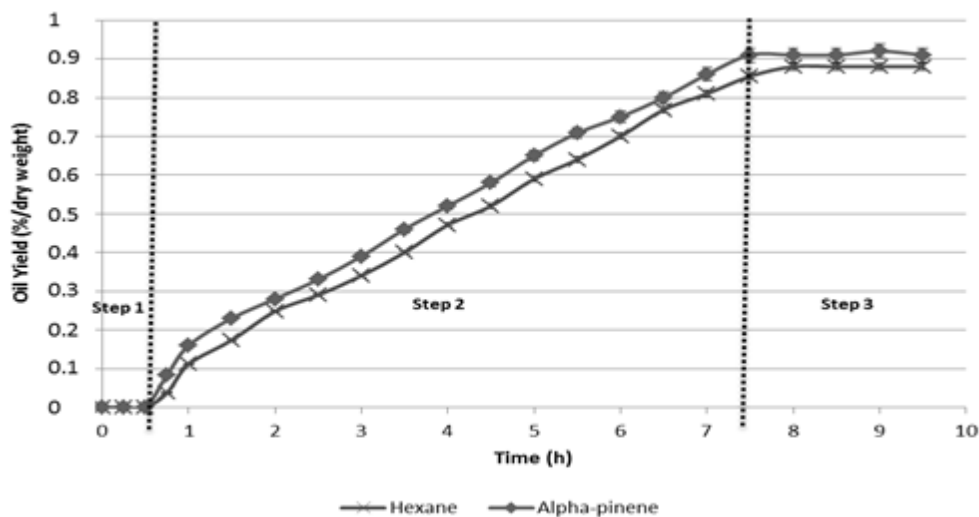


Figure 2. Extraction kinetics

2.2. Oil extraction yields from the different solvents

Extracted oils obtained using different solvents were compared in terms of qualitative determination. Yields of crude extract were thus checked and compared for all solvents using gravimetric determination and Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959). These results are listed in Table 2. The total lipids extraction (membranes and reserves lipids) was performed by the Bligh and Dyer method, which is reference method for marine lipid extraction, and therefore is considered as 100% yield. The microalgae used contain a total yield of 3.36 g per 100 g of dry weight biomass. As can be seen in this table, extracted mass of crude oil was higher using terpenes than n-hexane. This effect has already been noted by Liu and Mamidipally (Mamidipally and Liu, 2004), and might be due to the slightly more polar nature of terpenes compared with n-hexane. As a consequence more compounds can be extracted from the matrix. A higher dissolving ability of terpenes for polar lipids might also be pointed out by the higher temperature used to boil this solvent which can produce a lower viscosity of the analytes in the

matrix and, in consequence, a better diffusion rate of the solute from the solid phase to the solvent.

Table 2. Fatty acid composition of lipids extracted from *C. vulgaris*

Fatty Acids	Bligh and Dyer	Extracted amounts of fatty acids (%)			
		n-hexane	d-limonene	α -pinene	p -cymene
C14	1.29 \pm 0.04	1.83 \pm 0.11	0.98 \pm 0.31	1.38 \pm 0.06	1.43 \pm 0.08
C16:0	26.63 \pm 0.23	25.99 \pm 0.52	27.62 \pm 0.97	27.53 \pm 0.32	28.91 \pm 1.10
C16:1	4.93 \pm 0.32	2.03 \pm 0.09	4.95 \pm 0.66	3.02 \pm 0.21	4.47 \pm 0.06
C16:2	1.37 \pm 0.10	0.70 \pm 0.03	2.83 \pm 0.30	1.49 \pm 0.17	0.92 \pm 0.13
C16:3	3.27 \pm 0.18	1.65 \pm 0.48	2.35 \pm 1.67	1.26 \pm 0.18	1.39 \pm 0.13
C16:4	9.89 \pm 0.14	4.95 \pm 1.78	6.64 \pm 1.44	5.08 \pm 0.16	3.36 \pm 0.13
C18:0	1.67 \pm 0.31	4.44 \pm 0.08	6.37 \pm 1.00	4.58 \pm 0.11	3.92 \pm 0.21
C18:1	17.79 \pm 0.20	35.91 \pm 0.07	23.97 \pm 0.50	33.04 \pm 0.10	36.70 \pm 0.59
C18:2	6.99 \pm 0.36	7.32 \pm 0.24	5.87 \pm 0.61	7.37 \pm 0.31	5.49 \pm 0.35
C18:3	23.48 \pm 0.09	12.67 \pm 0.10	14.55 \pm 0.20	13.54 \pm 0.07	12.33 \pm 0.24
C18:4	2.50 \pm 0.10	2.13 \pm 0.09	3.64 \pm 0.29	1.36 \pm 0.08	0.66 \pm 0.10
C20:0	0.20 \pm 0.06	0.40 \pm 0.04	0.23 \pm 0.09	0.35 \pm 0.08	0.41 \pm 0.06
Σ SFAs	29.79	32.65	35.2	33.83	34.68
Σ MUFAs	22.72	37.94	28.9	36.06	41.17
Σ PUFAs	47.49	29.41	35.9	30.11	24.15
Oil Yield [%]	3.36 \pm0.02	0.88 \pm0.01	1.29 \pm0.01	0.91 \pm0.05	1.52 \pm0.03

2.3. Oil quality comparison results

The fatty acid composition of lipids extracted from *C. vulgaris* using terpenes and n-hexane as solvent were determined using GC analysis (Table 2). The main fatty acids identified in the oil fractions were 16:0, 18:1 and 18:2, with lower percentages of 14:0, 16:2, 16:3, and 20:0. Regarding the quantity and quality of fatty acids, there was no real variation in the lipid profile when extracted by d-limonene, alpha-pinene, para-cymene or n-hexane. The fatty acid present in largest amount was oleic acid (18:1) ranging between 23.97% and 36.70%. The presence of palmitic acid (16:0) was detected between 26.00 and 28.91% in the samples. This result was consistent with that obtained by Petkov and Garcia (Petkov and Garcia, 2007), 18:2 was observed in 25-56% on *C. vulgaris* biomass. In this work were also identified polyunsaturated fatty acids 18:2 and 18:3. Similar amounts of polyunsaturated fatty acids on *C. vulgaris* were also observed by other authors (Merichel Plaza, et al., 2012). The fatty acid 14:0 was present in small amounts in all samples, ranging from 0.98 to 1.83%. According to literature the percentage of 14:0 in freshwater microalgae does not exceed 1% (Petkov and Garcia, 2007). The unsaturated and saturated fatty acids content of *C. vulgaris* were 67.35% and 32.65% respectively.

In particular, lipids with high content of unsaturated fatty acids have been reported to have a reasonable balance of fuel properties (Rashid et al., 2008). The chain length of fatty acids was between C14 and C20 in this study. In a previous report (Ayhan Demirbas, 2009), fatty acids with chain length C14–C22 were recognized as the most common fatty acids contained in biodiesel. Therefore, fatty acids from *C. vulgaris* were suitable for the production of good quality biodiesel. It can be said that the proportion of the different fatty acids as well as the proportion of SFAs, PUFAs, or MUFAs has not been affected by the unusual conditions used in our experiment, in other words, the use of terpenes as solvent do not involve extraneous effects and/or artefacts on the composition of the extracted oils.

2.4. Microscopic observations

Microalgae were observed by microscopic after extraction as shown in Figure 3; microscopic observations revealed a morphological heterogeneity, these differences could be due to the use of various solvents. Microalgae without extraction have an intact parietal system and cellular content. For n-hexane and terpenes extraction, the parietal system has been damaged and the cellular content was emptied including the chlorophyll according to Fig 3b and 3c. We can observe a stronger degradation of the membrane for extraction with terpenes; where is possible to see free cell organelles.

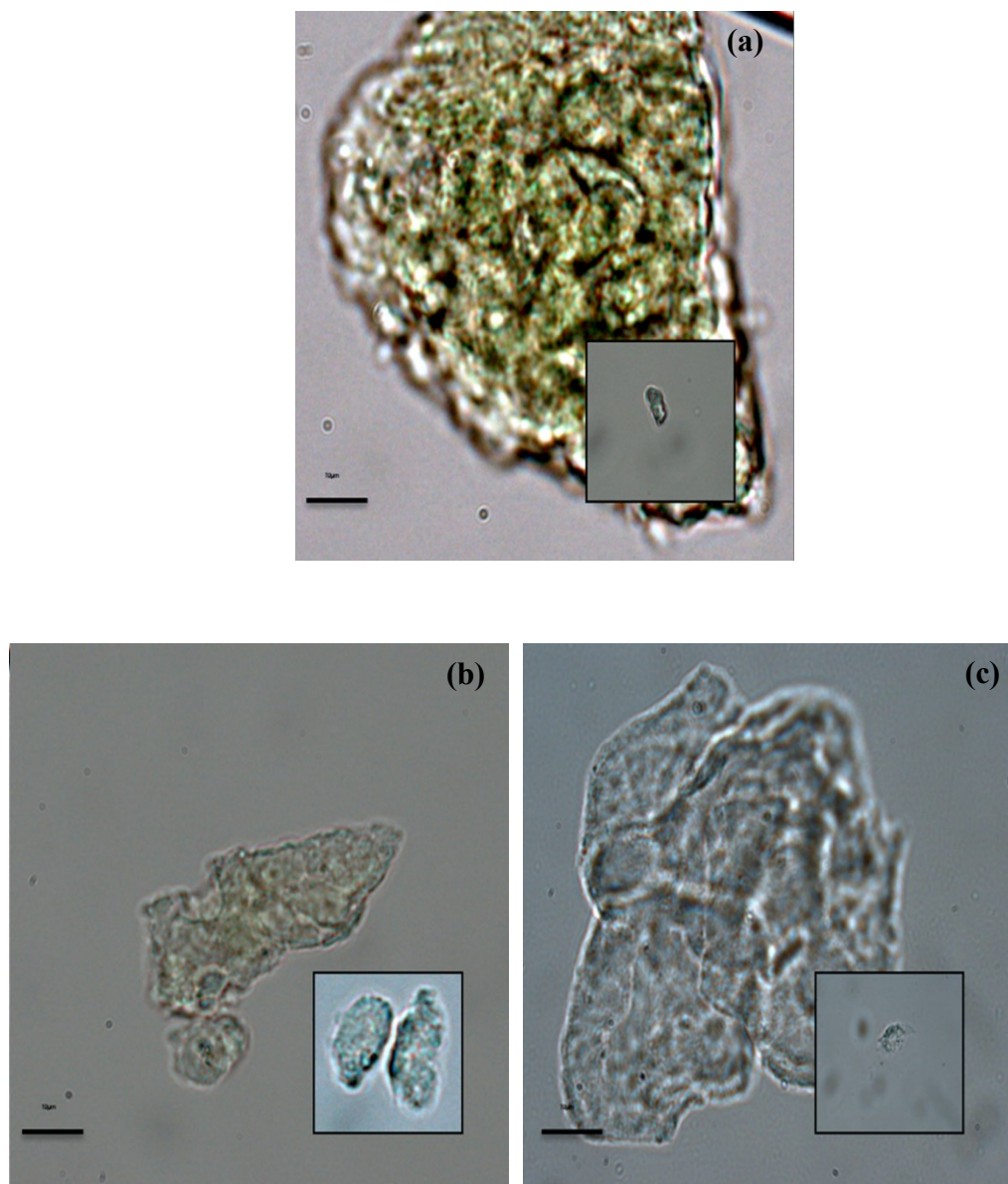


Figure 3. Microscopic observations of *Chlorella vulgaris* (a) native microalgae (without extraction). (b) n-hexane extraction. (c) terpenes extraction.

3. Experimental Section

3.1. Chemical and reagents

Solvents used during extraction experiments (d-limonene, alpha-pinene, para-cymene or n-hexane) were of analytical grade and were supplied by VWR International (Darmstadt, Germany). Methanol, sulfuric acid, BHT, toluene and NaCl used for the preparation of fatty acid derivatives were all of analytical grade and were also purchased from VWR International.

Various glasswares, Soxhlet apparatus and extraction thimbles used in extractions and fatty acid methyl ester preparations were supplied by Legallais (Montferrier-sur-Lez, France).

3.2. Microalgae cultivation and harvesting

Commercial Dry *Chlorella vulgaris* was obtained from Alphabiotech Company (France). The microalgae were grown in raceway, with ambient air. After cultivation, the biomass was harvested by membrane filtration, and then centrifuged to obtain microalgae paste. All the microalgal paste was stored at -80°C then freeze-drying.

3.3. Determination of the total lipid content

The content of total lipids in the microalgae was determined by mixing chloroform-methanol (1:2 v/v) using Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959). The mixture was agitated during 15 min in an orbital shaker at room temperature. The lipid fraction was then separated and the solvent evaporated under a nitrogen stream. The lipids obtained were weighted and calculated (% dry weight) as standard for the following calculation.

3.4. Soxhlet extraction

Oil was isolated from microalgae by means of Soxhlet extraction (F. Soxhlet, 1879). 10 grams of dry microalgae was weighed into a 30 mm x 80 mm cellulose thimble (Macherey-Nagel) and placed in a Soxhlet apparatus. The oil in the microalgae was extracted for 8h using 300 mL of four different solvents: d-limonene, alpha-pinene, para-cymene and n-hexane. In the case of n-hexane, solvent was removed; the weight of the algal oil was determined and used to calculate maximum recovery oil yields. Terpenes solvent removal was performed by Clevenger distillation. To perform, the Soxhlet apparatus was replaced by Clevenger glassware on the distillation flask, as shown in Fig 4. But before distilled water was added to the mixture composed of extracted oil and terpene solvent. During azeotropic distillation of the binary water-terpene mixture, terpene solvent was eliminated from the distillation flask. Both used terpene solvent and extracted oil were recovered separately by phase separation. Terpene solvent was recovered from the water layer by phase separation in the

“separating funnel” of the Clevenger glassware and the extracted oil was recovered from the water layer by phase separation in the distillation flask.

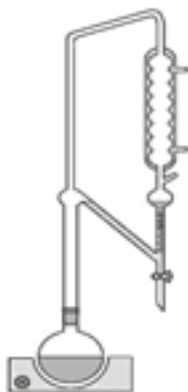


Figure 4. Clevenger distillation

3.5. Preparation of fatty acid methyl ester derivatives

The Morrison and Smith modified method was used to prepare fatty acid methyl ester (FAMES) derivatives (Morrison and Smith, 1964). An acid catalysis was employed during derivatization procedures by using a defined amount of 1 ml methanolic sulfuric acid (5%) solution added to a specific amount of extracted oil. Internal standard used was glyceryl triheptadecanoate ($C_{54}H_{104}O_6$). The mixture was then heated during 90 min at 85 °C. After, the flask was removed from heat and 1.5 ml of sodium chloride (0.9%) solution and 1 ml of n-hexane were added. The flask was stoppered and shook vigorously during 30 s then centrifuged at 4000 rpm during 2 min. A small amount of the organic layer was removed and transferred in a vial before being injected directly in a gas chromatography.

3.6. Chromatographic analysis of fatty acids

FAMES were separated, quantified and identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). Analyses were performed by using a Shimadzu QP2010 (Kyoto, Japan) gas chromatography. The instrument was equipped with a UB-Wax capillary column 30 m x 0.25 mm x 0.5 μ m (Varian) and the velocity of the carrier gas

(He) was at 35 cm/s. Injection of 2 μ l of the various samples were carried out with a splitless mode and the injector temperature was set at 250 °C. Oven temperature was initially 50 °C for 1 min and then progressed at a rate of 20°C/min from 50 °C to 190 °C and then increased from 190 °C to 230 °C at a rate of 2 °C/min. The temperature was then held at 230 °C for 15 min. The mass spectra were recorded at 3 scan/s from 50 to 380 a.m.u and the ionization mode was e.i at 70 eV. Identification of common fatty acids was a performed using the NIST'98 [US National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, MD, USA] mass spectral database.

3.7. Microscopic observations

The impacts of the extracting methods on the structure of microalgae cells were examined using light microscopy. Microalgae residues were collected before (native microalgae) and after extractions and introduced in 70% ethanol at 6°C. Microscopic observations were performed with a Leica DM 2000 microscope (Wetzlar, Germany) equipped with DFC 30F digital camera (LAS software).

4. Conclusions

The aim of the present study was to investigate an alternative procedure for the determination of oils using terpenes as alternative solvents. This aim was reached with good results in term of gravimetric determination and fatty acid composition. It can be said that the proposed investigation is a valuable and effective method for oils' determination in microalgae. However, it is important to note that high temperature of terpenes can trigger a positive impact on lipid yield. It would be interesting to test the effectiveness of under pressure n-hexane at 176 °C.

Références Bibliographiques

A

Albuquerque, M.R.J.R., Lemos, T.L.G., Pessoa, O.D.L., Nunes, E.P., Nascimento, R.F., Silveira, E.R., **2007**. Chemical composition of the essential oil from *Vernonia scorpioides* (Asteraceae). *Flavour Fragr. J.* 22, 249–250.

Ayhan Demirbas, **2009**. Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Convers. Manag.* 50, 14–34.

B

Baldasseroni, A., Bavazzano, P., Li Donni, V., Buiatti, E., Lanciotti, E., Lorini, C., Toti, S., Biggeri, A., **2003**. Occupational exposure to n-hexane in Italy--analysis of a registry of biological monitoring. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 76, 260–266.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochem. Cell Biol.* 37, 911–917.

C

Charles M. Hansen, **1999**. Hansen Solubility Parameters: A user's handbook.

D

Dobarganes, M. C., Márquez Ruiz, G., **1998**. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. *Grasas y Aceites* 49, 331–335.

E

Emile Béliard, Pierre Mafart, **2004**. Génie Industriel Alimentaire. Tome 2, Techniques séparatives.

F

F. Soxhlet, **1879**. *Dinglers Polyt J* 232, 461.

G

Gornay, J., **2006**. Transformation par voie thermique de triglycérides et d'acides gras. Application à la valorisation chimique des déchets lipidiques. Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy.

H

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., **2006**. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* 98, 136–148.

I

INRS, **2012**. Fiche de données sécurité; Les agrosolvants *ED 4230*.

K

Kislik, V.S., **2012**. Solvent extraction. Classical and Novel approaches. *Elsevier, Amsterdam*.

L

Liang, K., Zhang, Q., Cong, W., **2012**. Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Lipid from Microalgae. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11771–11776.

Liu, S.X., Mamidipally, P.K., **2005**. Quality Comparison of Rice Bran Oil Extracted with d-limonene and n-hexane. *Cereal Chem.* 82, 209–215.

M

Mamidipally, P.K., Liu, S.X., **2004**. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 122–125.

Manini, P., Andreoli, R., Niessen, W.M.A., **2004**. Liquid chromatography-mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *J. Chromatogr. A* 1058, 21–37.

Merichel Plaza, Susana Santoyoa, Laura Jaimea, Belkis Avalob, Alejandro Cifuentesa, Guillermo Reglerob, Guillermo García-Blairsy Reinac, Francisco Javier Señoránsd, Elena Ibáñez, **2012**. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *LWT - Food Sci. Technol.* 46, 245–253.

Mitsuyoshi Yatagaia,, Toshiya Sato*, Toshio Takahashia, **1985**. Terpenes of leaf oils from Cupressaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* *13*, 377–385.

Morrison, W.R., Smith, L.M., **1964**. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *J. Lipid Res.* *5*, 600–608.

Mouahid, A., Crampon, C., Toudji, S.-A.A., Badens, E., **2013**. Supercritical CO₂ extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. *J. Supercrit. Fluids* *77*, 7–16.

P

Petkov, G., Garcia, G., **2007**. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochem. Syst. Ecol.* *35*, 281–285.

R

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B.R., Knothe, G., **2008**. Moringa oleifera oil: a possible source of biodiesel. *Bioresour. Technol.* *99*, 8175–8179.

S

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., Roessler, P., **1998**. Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae; *Close-Out Report*.

T

Toplisek T., Gustafson R., **1995**. Cleaning with d-limonenes: a substitute for chlorinated solvents. *Precis Clean* *3*, 17–20.

V

Virot, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F., **2008**. Total Lipid Extraction of Food Using d-Limonene as an Alternative to n-hexane. *Chroma* *68*, 311–313.

Virot, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F., **2008**. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J. Chromatogr. A* *1196-1197*, 147–152.

Chapitre IV. Les solvants alternatifs pour l'extraction de lipides de micro-algues humides

∅ Celine Dejoye Tanzi, Maryline Abert Vian, Farid Chemat

"New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process"

2013. *Bioresource Technoogy* 134, 271–275.

Ce chapitre IV traite de la conception d'un nouveau procédé d'extraction de la fraction lipidique à partir de micro-algues humides (80% d'eau) par des solvants alternatifs de type terpénique en substitution au solvant pétrochimique comme le n-hexane. Ce travail expose une alternative innovante au problème de séchage de la biomasse pour l'extraction des lipides.

IV.1. Introduction

Il existe aujourd'hui de nombreux procédés et techniques d'extraction ou de conversion d'huiles algales en biodiesel incluant l'extraction par solvant organique, l'extraction au CO₂ supercritique ou la *trans*-estérification *in situ* (Andrich et al., 2005; Patil et al., 2011a). Cependant, l'efficacité de ces techniques est diminuée par la présence d'eau dans le milieu. En effet, même après concentration, la biomasse algale retient de l'eau interstitielle qui joue le rôle de lubrifiant et empêche le bon déroulement de l'étape d'extraction. Avant récolte, la concentration micro-algale se situe à 0,1% de poids sec et après le processus de concentration elle se situe à 20% de poids sec; l'eau est donc présente à tous les stades et échelles du procédé. Dans un objectif de valorisation de la fraction lipidique, le séchage préalable de la biomasse est donc souvent requis. L'approche conventionnelle consiste à séparer le solide du liquide, sécher la biomasse et enfin extraire les lipides (Figure IV-1).

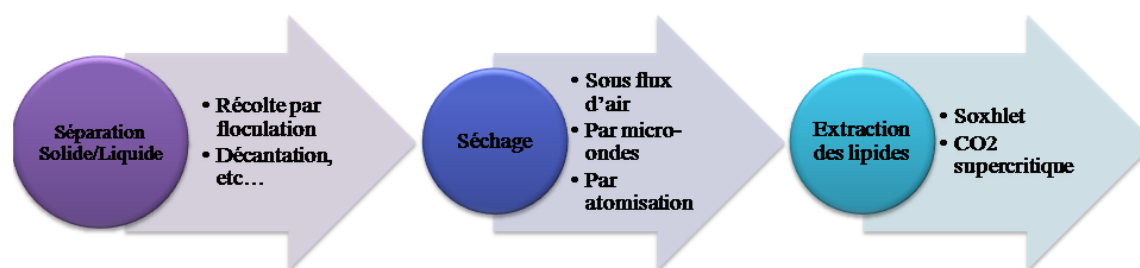


Figure IV-1: Approche conventionnelle

Il existe différents procédés de séchage mais pour la plupart, cette étape reste très coûteuse en énergie. L'intérêt, à ce jour, est de diminuer leur consommation énergétique, voire de pouvoir s'en affranchir. Ce chapitre s'inscrit clairement dans cette problématique où la matière première utilisée est de la biomasse micro-algale à 80% d'humidité et à partir de laquelle les lipides vont être extraits.

IV.2. Une nouvelle procédure pour l'extraction de lipides à partir de biomasse algale humide

IV.2.1. Résumé de l'article

L'article "New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: a green clean and scalable process" a été publié dans "*Bioresource Technology*" en 2013 (Vol 134, p 271-275).

Après avoir démontré l'efficacité des solvants terpéniques pour l'extraction des lipides issus de micro-algues sèches, l'objectif a été ici de développer un procédé d'extraction capable d'extraire les lipides à l'aide de ces solvants terpéniques sur une biomasse algale à 80% d'humidité. Nous avons montré précédemment que l'extraction par la technique du Soxhlet à partir de biomasse séchée n'apparaissait pas comme la méthode idéale pour l'extraction des lipides marins en raison du faible rendement lipidique, du long temps d'extraction et enfin de la limitation au passage industriel du procédé. Par ailleurs, nous avons vu que le séchage de la biomasse est très impactant dans le coût énergétique global de la chaîne de valeur. Ce travail vise donc à développer une méthode d'extraction permettant d'extraire les lipides sans séchage préalable de la biomasse à l'aide de solvants terpéniques (d-limonène, α -pinène et p-cymène). Pour la suite du manuscrit, le procédé d'extraction innovant a été baptisé SDEP pour Simultaneous Distillation and Extraction Process.

Le schéma IV-2 détaille la démarche expérimentale suivie.

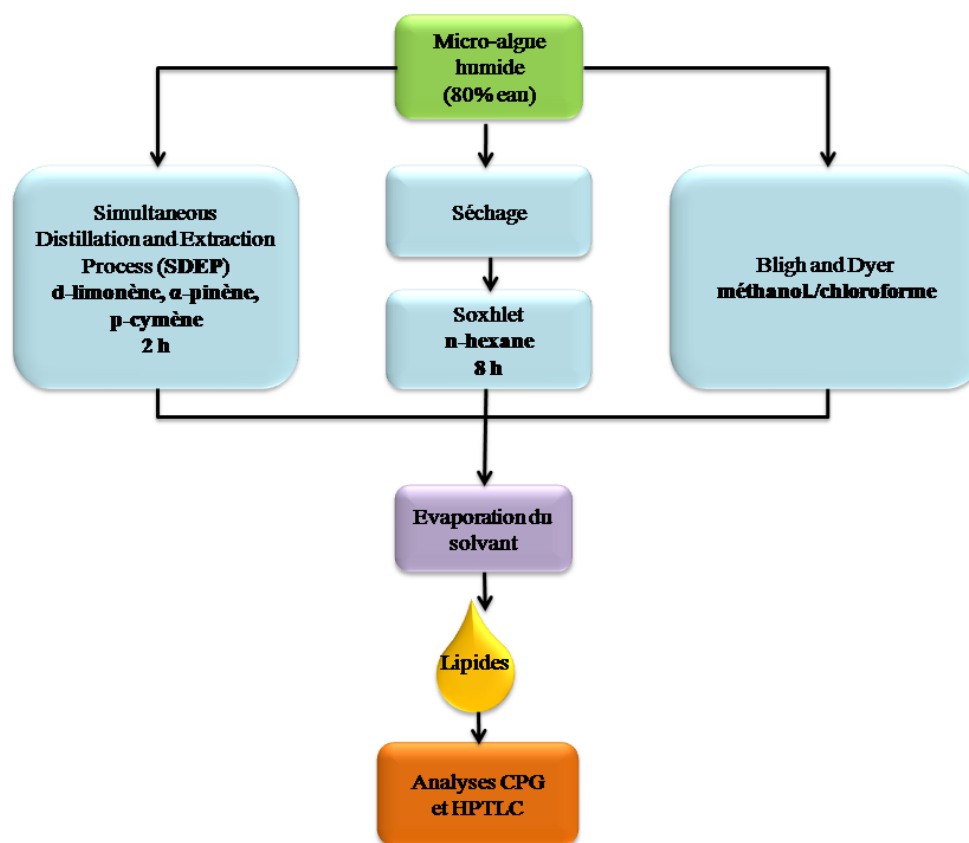


Figure IV-2 : Démarche expérimentale de l'article: " New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process"

En amont, une étude théorique, visant à simuler la solubilité des lipides marins dans les solvants étudiés a été réalisée grâce à la théorie des paramètres de solubilité d'Hansen (logiciel « Hansen SolubilityParameters in Praticce »). D'après la théorie d'Hildebrand (précurseur de la théorie de Hansen), la dissolution est effective quand un soluté est entouré d'un solvant dont sa valeur de DEC (Densité d'Energie de Cohésion) est similaire à celle du soluté. Ainsi, pour qu'une substance solide quelconque soit soluble dans un liquide, ou que deux liquides soient miscibles, il faut que leur situation dans l'espace soit voisine c'est-à-dire que leurs paramètres de solubilité soient proches. Ainsi, les composés avec des paramètres d'Hansen similaires ont une grande affinité l'un pour l'autre. Appliquée à notre étude, cette simulation a permis de montrer l'affinité des solvants terpéniques vis-à-vis des lipides marins de deux espèces de micro-algues étudiées dans ce chapitre: *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina*. Les solvants ont pu alors être classés en fonction de leur distance les séparant des composés à extraire (triglycérides, diglycérides, monoglycérides et acides gras libres). Les plus proches sont ceux qui thermodynamiquement ont le plus de chance de former un mélange stable et donc de dissoudre les lipides extraits. Ainsi, la détermination

expérimentale des paramètres de solubilité de Hansen des lipides marins et des solvants potentiels montre que le p-cymène est le meilleur candidat parmi l'ensemble des solvants terpéniques pour extraire les triglycérides de *N. oculata* et *D. salina* (Figure IV-3). En outre, l' α -pinène représente le solvant possédant le moins d'affinité avec les lipides provenant de ces deux micro-algues.

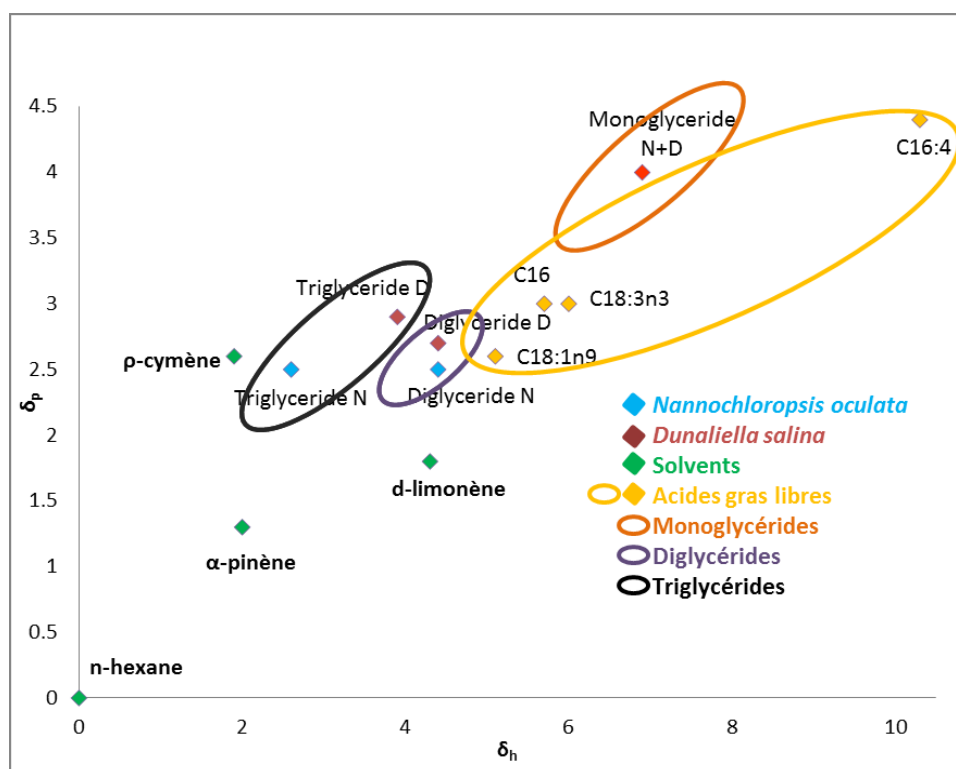


Figure IV-3: Modélisation du pouvoir de solubilité de différents solvants pour l'extraction des lipides de *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* (logiciel : Hansen Solubility Parameters in Practice)

Le procédé SDEP (Simultaneous Distillation and Extraction Process) développé dans ce chapitre est un procédé qui permet « one pot » la déshydratation de la biomasse grâce à la présence du solvant terpénique et l'extraction des lipides. La biomasse est en contact avec le solvant et est chauffée progressivement par convection de 25°C à 100°C. Il est bien connu que les mono-terpènes hydrocarbonés forment avec l'eau un mélange azéotrope aux alentours de 100°C (M. Chavanne et al., 1991). Ainsi, dans notre milieu, l'eau intrinsèque de la biomasse et le solvant terpénique (100°C) vont former un azéotrope qui va ainsi permettre l'élimination *in situ* de l'eau du milieu. Dans un second temps, la phase d'extraction des lipides a lieu. Enfin, la phase liquide (solvant terpénique +lipides) est ensuite distillée (Clevenger) afin de récupérer le solvant dans un

dispositif de réception d'une part et les lipides restés dans le réacteur d'autre part. Le solvant terpénique peut être recyclé pour de futures extractions et la biomasse, exempt de lipides, récupérée pour une valorisation ultérieure (méthanisation, combustible,...). Les lipides extraits sont ensuite récupérés dans un solvant pour analyses. Différentes analyses ont été réalisées sur les extraits telles que la teneur en lipides, la répartition des différentes classes de lipides et la composition en acides gras.

Dans un premier temps, les teneurs en lipides des extractions obtenus pour chacune des méthodes d'extraction testées ont été calculées (Figure IV-4 et IV-5). Le maximum a été obtenu avec la méthode de Bligh and Dyer (méthode de référence estimant l'extraction totale soit 100% des lipides contenus dans la micro-algue) pour les deux espèces de micro-algues *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* avec 24 et 4 % (g de lipides totaux pour 100 g de matière sèche) respectivement. Les taux d'extraction obtenus avec les "SDEP terpènes" représentent pour *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* environ 82 et 76 % respectivement des lipides totaux extraits avec la méthode de Bligh and Dyer. En revanche, l'extraction par Soxhlet apparait une fois de plus comme inférieure aux autres méthodes avec 35 et 47 % de taux d'extraction des lipides totaux. L'extraction Soxhlet sur *Dunaliella salina* montre un taux supérieur. Cela est probablement dû à la morphologie de cette micro-algue qui ne possède quasiment pas de paroi cellulaire à la différence de *Nannochloropsis oculata*.

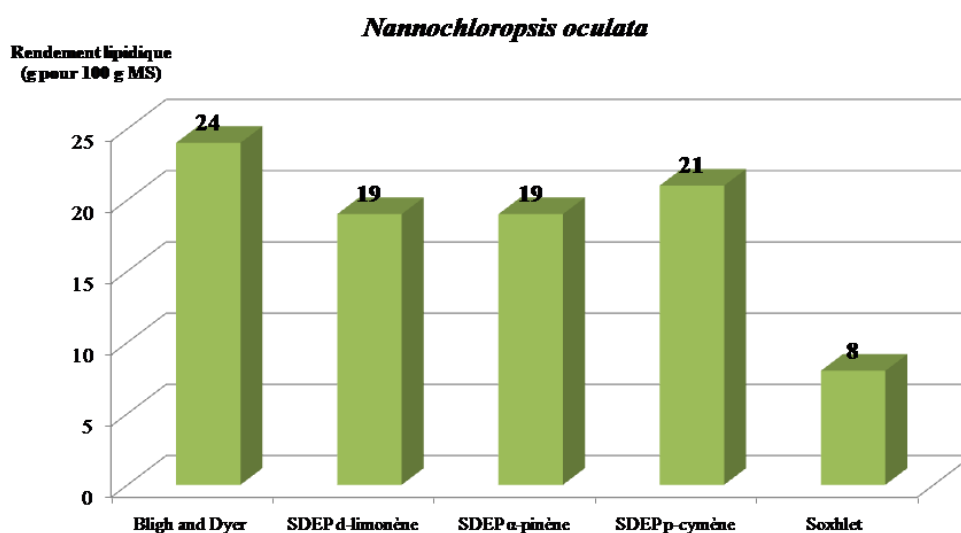


Figure IV-4: Comparaison des rendement lipidiques pour *Nannochloropsis oculata*

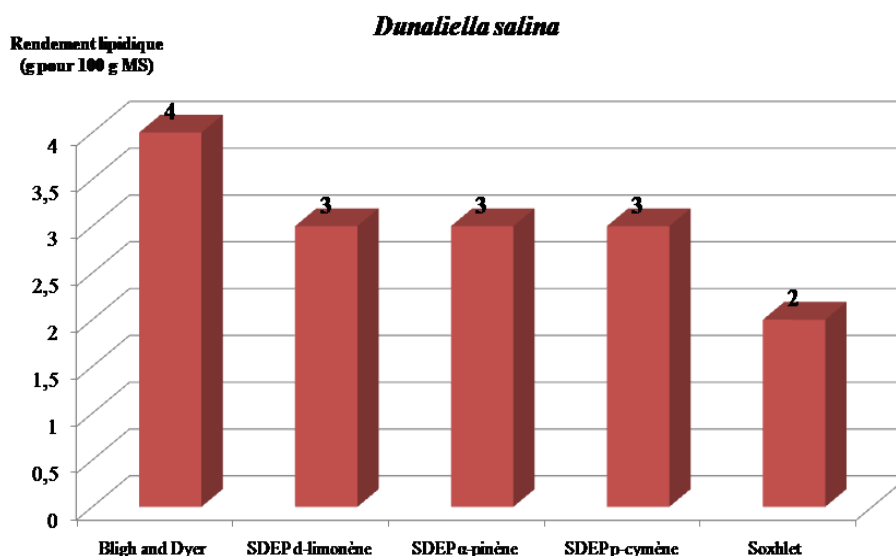


Figure IV-5: Comparaison des rendements lipidiques pour *Dunaliella salina*

Les rendements lipidiques élevés pour les extractions SDEP nous ont amené à se poser un certain nombre de questions sur la diffusion des lipides dans la cellule puis vers le milieu extra-cellulaire. De façon générale sur une matrice végétale (cellule végétale), la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice est généralement rapide par rapport aux autres étapes du processus de diffusion. En revanche, la libération du soluté vers le milieu extra-cellulaire constitue un processus beaucoup plus lent et demande une quantité de solvant suffisante. Après diffusion à l'intérieur des cellules de micro-algues, le solvant s'enrichit de lipides puis la diffusion va s'effectuer vers la surface extérieure de la cellule. Dans le cas de cellules avec des parois peu perméables la libération sera très lente. Dans notre cas, en tout premier lieu l'eau environnante des cellules est éliminée ; la barrière causée par cette eau environnante va donc disparaître et faciliter la diffusion du solvant terpénique dans la cellule. En outre, les phénomènes de transfert du solvant vers les cellules peuvent être affectés par différents facteurs tels que le soluté à extraire, le solvant, la température et la présence d'eau. Les lipides (soluté) influencent ici la diffusion par leur structure moléculaire, leur taille, leur localisation et leur interactions avec d'autres composés du milieu. Dans notre cas, les lipides à extraire sont localisés à l'intérieur des cellules et se présentent sous forme libre. La taille des molécules de solvant, la viscosité et la masse volumique vont également influencer la diffusion. Les solvants terpéniques disposent d'une viscosité élevée de l'ordre de 1 centiPoise (cP) à 20°C. Cependant, lors du processus d'extraction SDEP, ces solvants

vont atteindre leur température d'ébullition (entre 150 et 170°C pour les 3 solvants) où leur viscosité va avoisiner 0,5 cP, valeur qui permettra une meilleure diffusion du solvant dans et à l'extérieur de la cellule.

Ainsi, l'élévation de la température va augmenter la solubilité et la diffusivité de la solution. Ces fortes températures vont permettre également d'accroître la perméabilité des parois cellulaires et ainsi favoriser l'éclatement des cellules. Néanmoins, un compromis doit s'établir entre l'élévation de température et la dégradation potentielle des composés à extraire. Pour cela, les classes de lipides des extraits ont été analysées afin d'identifier toute éventuelle dégradation. La répartition des classes de lipides a été réalisée par HPTLC.

De façon générale, la répartition des classes de lipides montre que, pour les deux espèces de micro-algues étudiées, les extraits lipidiques SDEP possèdent une proportion de triglycérides légèrement inférieure aux extraits Bligh and Dyer. Cette différence peut être attribuée à une dégradation des triglycérides en acides gras libres et/ou diglycérides.

En outre, le p-cymène semble se démarquer des deux autres solvants terpéniques en permettant une meilleure extraction des triglycérides. Ce résultat vient appuyer les observations émises lors de la simulation des paramètres de solubilité de Hansen.

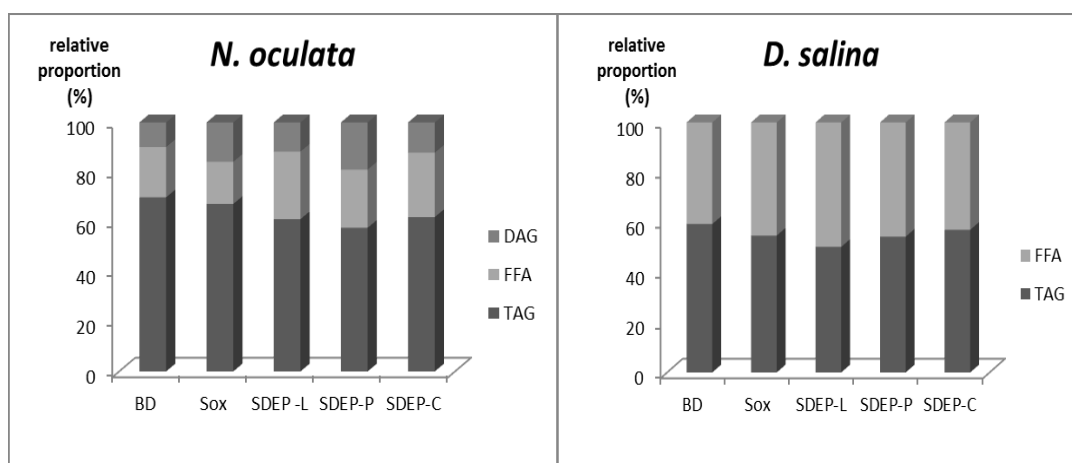


Figure IV-6: Distribution des classes de lipides des extraits lipidiques par HPTLC

Parallèlement, les extraits ont été analysés par CPG afin d'identifier la composition en acides gras des différents extraits et de les comparer entre eux. Les profils d'acides gras des extraits de *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* sont représentés sur les Figures IV-7 et IV-8 ainsi qu'un chromatogramme en Figure IV-9.

Dans les extraits de *N. oculata*, quatre acides prédominent, l'acide palmitique (C16:0) de 21 à 22 %, l'acide oléique (C18:1n9) de 26 à 27 %, l'acide linoléique (C18:2n6) de 15 à 16 % et l'acide linoléique (C18:3n3) de 19 à 20 %.

Dans les extraits de *D. salina*, cinq acides gras prédominent, l'acide palmitique (C16:0) de 35 à 46 %, l'acide hexadécatétraénoïque (C16:4) de 8 à 10 %, l'acide oléique (C18:1n9) de 6 à 13 %, l'acide linoléique (C18:2n6) de 7 à 9 % et l'acide linoléique (C18:3n3) de 17 à 31 % (Figure IV-9).

D'une manière générale, la procédure SDEP (quelque soit le solvant terpénique utilisé) n'a pas engendré de dégradation ou créé une sélectivité en comparaison des méthodes conventionnelles. Ces résultats sont discutés de manière plus précise dans l'article relatif à ces travaux « New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process ».

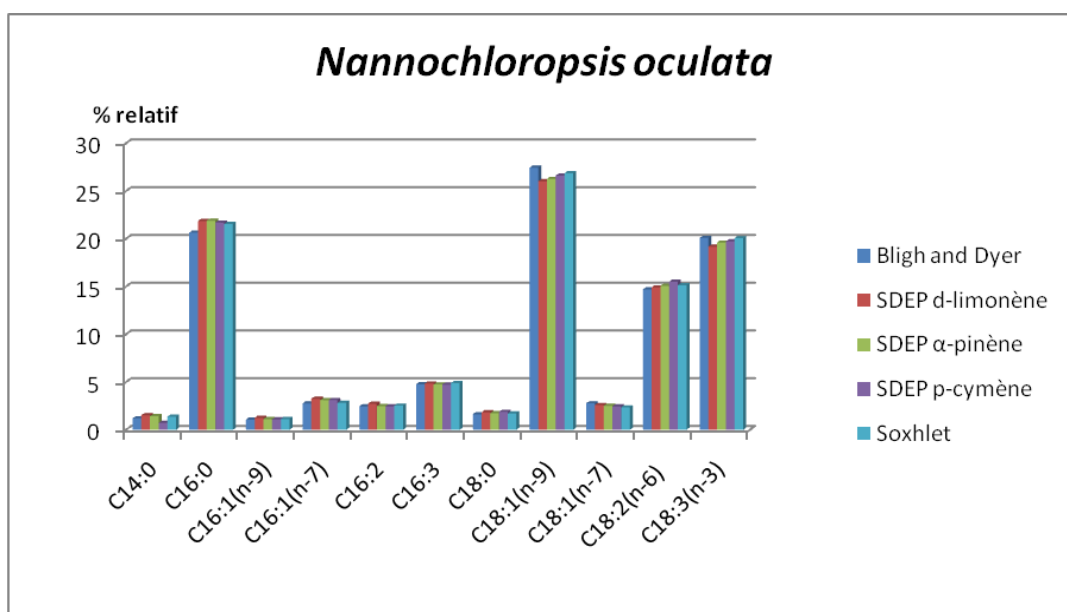


Figure IV-7: Composition en acides gras des extraits de *Nannochloropsis oculata* selon les différentes méthodes d'extraction

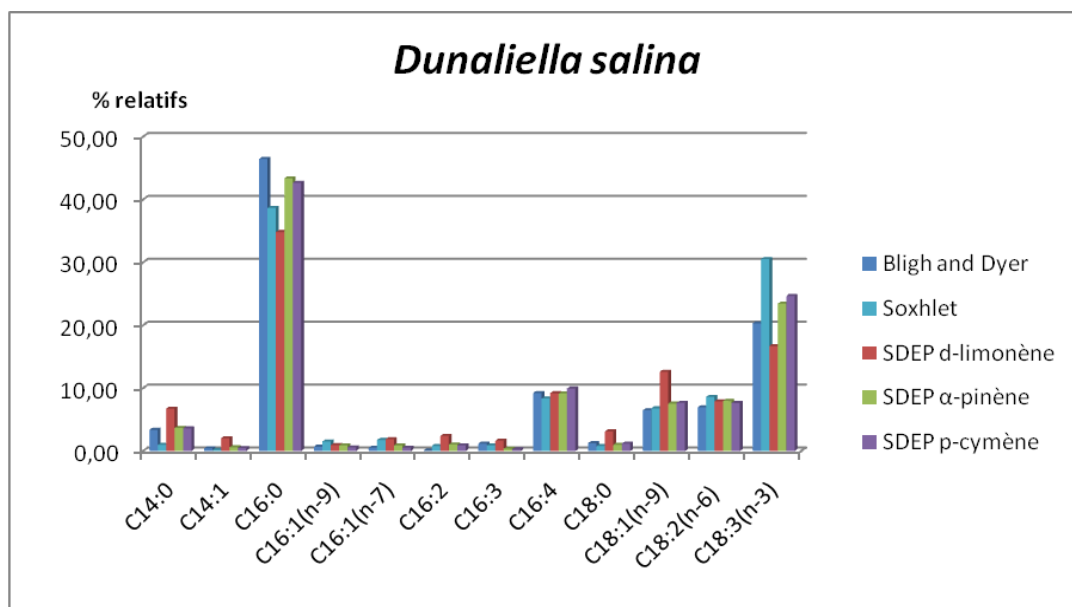


Figure IV-8: Composition en acides gras des extraits de *Dunaliella salina* selon les différentes méthodes d'extraction

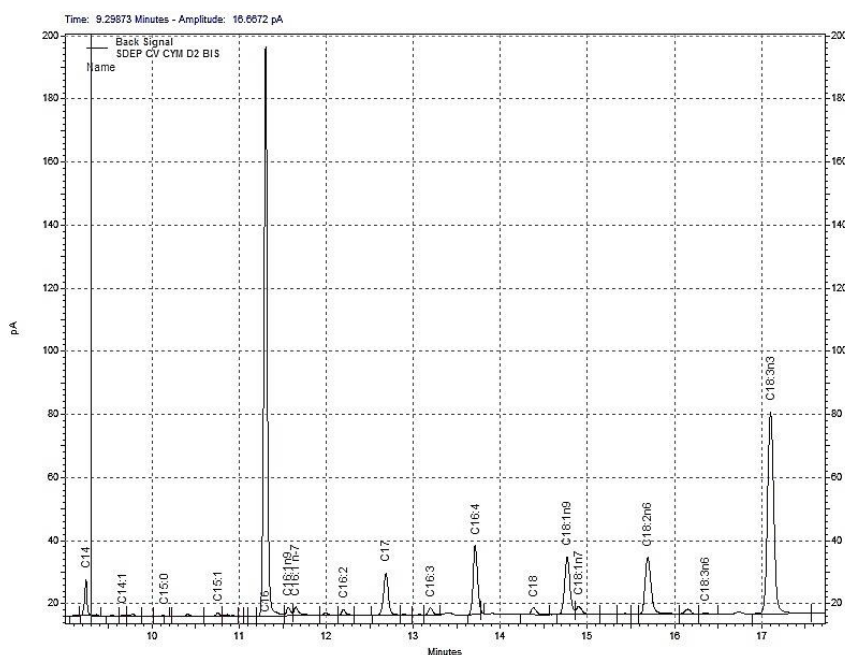
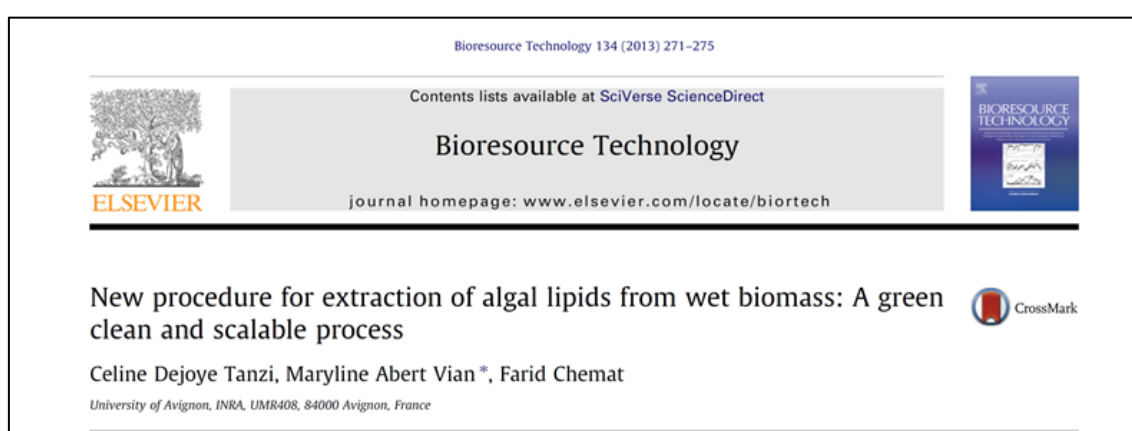


Figure IV-9 : Chromatogramme d'un extrait lipidique SDEP de *Dunaliella salina*

Cette étude a donc permis d'étudier la faisabilité du procédé SDEP pour l'extraction des lipides marins à partir de biomasse humide. Le procédé SDEP a permis d'obtenir de bons résultats en terme de teneur en lipides, de répartition des classes de lipides et de composition en acides gras en comparaison à la méthode de référence Bligh and Dyer. La technique s'avère donc être une méthode innovante et efficace pour l'extraction des lipides sur une biomasse algale à plus de 80% d'eau. La diminution du

temps d'extraction par rapport à l'extraction au Soxhlet en incluant le séchage de la biomasse (8 + 48h à 2h) a un impact non négligeable sur la consommation énergétique globale du procédé. De plus, l'utilisation de solvants verts issus de ressources renouvelables s'inscrit dans une démarche de chimie verte. Les procédures SDEP ont nécessité une énergie de 2,15 kWh alors que la procédure Soxhlet 8,84 kWh (séchage non compris) pour 1 g de lipide extrait.

IV.2.2. Article



Abstract: A new procedure, called Simultaneous Extraction and Distillation Process (SDEP), for lipid extraction from wet microalgae (*Nannochloropsis oculata* and *Dunaliella salina*) was reported. This method does not require a pre-drying of the biomass and employs alternative solvents such as d-limonene, α -pinene and p-cymene. This procedure has been compared with Soxhlet extraction (Sox) and Bligh & Dyer method (B&D). For *N. oculata*, results showed that SDEP-cymene provided similar lipid yields to B&D (21.45% and 23.78%), while SDEP-limonene and pinene provided lower yields (18.73% and 18.75% respectively). For *D. salina*, SDEP-Pinene provided the maximum lipid yield (3.29%) compared to the other solvents, which is quite close to B&D result (4.03%). No significant differences in terms of distribution of lipid classes and fatty acid composition have been obtained for different techniques. Evaluation of energy consumption indicates a substantial saving in the extraction cost by SDEP compared to the conventional extraction technique, Soxhlet.

Keywords: Wet lipid Extraction, Microalgae, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella salina*, Terpenes

1. Introduction

Petroleum reserves depletion and global climate change have strongly encouraged the development of fuel production from various feedstocks such as vegetable oils, waste cooking oils, animal fat and microalgae. Among these options, microalgae have been recognized as potential good sources for biofuel production because they synthesize and accumulate large quantities of neutral lipids (20–50 % dry weight of biomass) and grow at high rates (Demirbas, 2008). In addition, microalgae can grow on non-arable, nutrient-poor land that cannot support conventional agriculture (Singh and Gu, 2010). A recent life-cycle assessment (LCA) of biofuel production from microalgae feedstocks mentioned that drying and n-hexane extraction accounted for up to 90% of the total process energy (Lardon et al., 2009). The extraction of crude oil is usually performed with petroleum solvents such as conventional n-hexane, chloroform and methanol, with techniques are highly energy-consumption and environmentally damaging (Halim et al., 2012). Other extraction processes such as supercritical CO₂, expelling, microwave-ultrasonic assisted extraction have also been reported (Cheng et al., 2011). Many processes have been investigated and reported for converting directly wet algae to crude biodiesel or biocrude (Anastasakis and Ross, 2011; Biller and Ross, 2011; Biller et al., 2011; Patil et al., 2011a, 2011b). But this biocrude differs from biodiesel that we want to extract as it is composed primarily of hydrocarbons in contrast to biodiesel which is composed of lipids in particular FAME after transesterification.

However, various conventional methods are available for oil extraction, but they generally require long extraction times, petroleum-based solvents, dried biomass with water content no more than 10% and high energy inputs. Upon harvesting, typical microalgal concentrations in cultures range from about 0.1-1.0% (w/v) (Cooney et al., 2009). This means that as much as 1000 times the amount of water per unit weight of microalgae must be removed before attempting oil extraction. The microalgae paste obtained from centrifugation (dewatering step) contains as much as *ca.* 80% water content. Therefore energy consumption for drying microalgae is dramatically high. A

lipid extraction step that eliminates biomass drying and petroleum solvent use could lead to significant energy and cost savings.

Here we propose a new procedure of lipid extraction from microalgae, such as *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) and *Dunaliella salina* (*D. salina*), that does not require drying of the harvested microalgal biomass and employs bio-solvents recognized as environmentally safer (Virost et al., 2008b). Terpenes are natural solvents existing both in the citrus fruits and in many other plants, with extraordinary technical and chemical properties. Mamidipally and Liu recently demonstrated that the industrial extraction of oil from rice bran was possible by using terpene such as d-limonene instead of the regular *n-hexane* (Liu and Mamidipally, 2005; Mamidipally and Liu, 2004).

Extracted lipids obtained using this new procedure, conventional Soxhlet with *n-hexane* and Bligh & Dyer method have been compared in term of total lipid content, lipid classes distribution and fatty acid composition.

2. Materials and methods

2.1. Strain, culture and harvesting conditions

N. oculata and *D. salina* were obtained by Greensea Company (Meze, France). *N. oculata* was incubated in tubular reactor at ambient temperature under deficiency conditions to obtain a high rate of lipids in the biomass. *D. salina* was grown in photo-bioreactor at ambient temperature with good sunniness under favourable conditions. For both, harvesting is being performed by centrifugation, resulting in a 20% dry weight paste that is directly frozen (-25°C).

2.2. Extraction methods for total lipids

2.2.1 Bligh and Dyer method (B&D)

Total lipids content of both microalgae was determined using a modified B&D method (Bligh and Dyer, 1959) which is already described in Adam et al., 2012.

2.2.2 Soxhlet method (Sox)

Lipids were isolated from microalgae by means of Soxhlet extraction (F. Soxhlet, 1879). Lipids were extracted from 10 grams of dry microalgae for 8h using 300 mL of n-hexane. After the extraction, solvent was eliminated with a vacuum rotary evaporator. Extractions were performed in triplicate and the mean values were reported. Lipid extracts were dried under a stream of N₂ and re-suspended in solvent for HP-TLC or GC-FID analysis.

2.2.3 SDEP method

For SDEP extraction, 12 g ± 0.5 g of 20% dry weight microalgae paste were placed in a 500mL round-bottomed flask. 100mL of terpene solvent (p-cymene, d-limonene or α-pinene) was added in order to immerse the wet microalgae sample. The round-bottomed flask was surmounted by a modified Dean stark receiver with a 3-way valve and fitted with a condenser (Fig. 1). At the beginning of the experiment (step 1), the electrical heating was maximized until collection of the first droplets of microalgae water in the modified Dean stark receiver with a 3-way valve. Then the heating was adapted until most of the water had been distilled and it was continued to allow lipid extraction step (step 2) with terpene solvent. The extraction was performed for 30 min. Then, the terpene elimination took place (step 3 and 4) and for that water was re-introduced by adjusting the 3-way valve to form a binary water-terpene mixture. To eliminate d-limonene from the distillation flask, we used the property that terpenes are traditionally extracted from their matrix by using a technique called hydrodistillation thus inducing the use of an azeotropic distillation to below the boiling point of terpene under the boiling point of the water (boiling point of the azeotrope : 97.4 °C). Terpene solvent was recovered from the water layer by phase separation in the modified Dean stark receiver and the extracted lipids were recovered from the water layer by phase separation in the distillation round-bottomed flask. Thus, the SDEP procedure was allowed elimination of microalgae water, extraction of lipids and elimination of terpene solvent in a single “in situ” step. Terpene solvent was recuperated at 100% and purity levels show that it can be recycled for other uses, including other SDEP processes. Lipid extracts were analysed by GC-FID (against an external calibration with the pure

solvent) and did not contain contamination by solvent (less than 0.01% of solvent in lipid extract). Extractions were performed in triplicate and the mean values were reported. Lipid extracts were dried under a stream of nitrogen and re-suspended in solvent without purification for HP-TLC or GC-FID analysis.

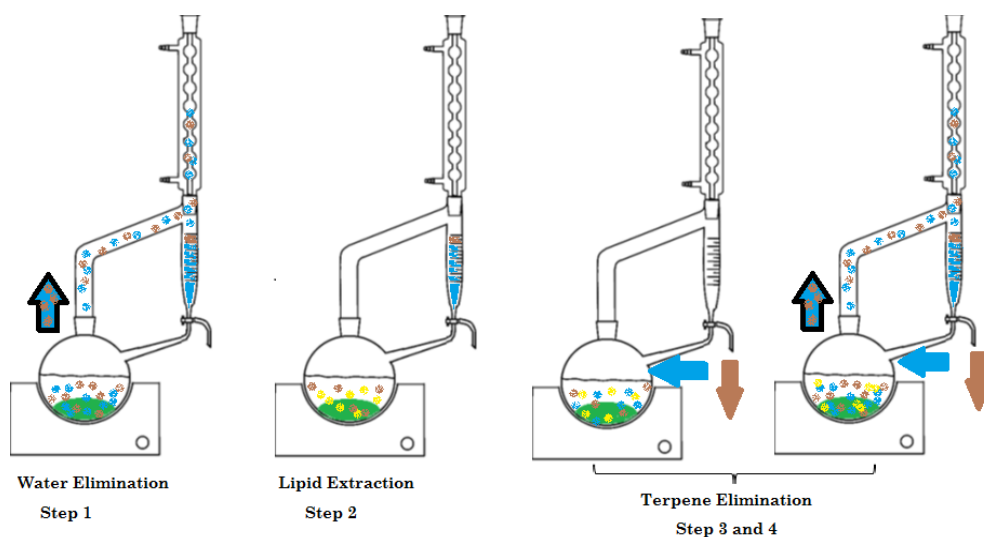


Figure 1. Simultaneous Distillation Extraction Process (SDEP) (blue: water biomass, brown: terpene solvent, yellow: lipids, green: microalgae)

2.3. Analysis of total lipids

2.3.1. Gravimetry

Total lipid content was quantified by weight after total drying.

2.3.2. High Performance Thin-Layer Chromatography (HP-TLC)

Lipids were detected by charring and quantified using a CAMAG 3 TLC scanning densitometer (CAMAG, Muttenz, Switzerland) with identification of the classes against known polar and neutral lipid standards. Typically, Lipid extract was loaded as a spot onto 20 × 10 cm silica gel 60 F254 HPTLC plates (Merck KGaA, Germany) using an ATS 5 automatic TLC sampler (Camag, Switzerland). Plates were then developed in an ADC2 automatic developing chamber (CAMAG, Switzerland) using first a methyl acetate/isopropanol/chloroform/methanol/KCl (0.25% solution) (25:25:25:10:9) mixture running to a height of 5.5 cm from the origin and then an-hexane/diethyl ether/glacial

acetic acid mixture (80:20:2) to a height of 8.5 cm from the origin. After dried, the plate was dipped for 6s in a modified CuSO₄ reagent (20 g CuSO₄, 200 ml methanol, 8 ml H₂SO₄, and 8 ml H₃PO₄) then heated at 141 °C for 30 min on a TLC plate heater and finally scanned using a TLC Scanner 3 with WinCATs software (CAMAG). The densitometry data are reported as values which are expressed as percent of lipid class in total microalgae lipids.

2.3.3 GC Analysis

Fatty acids methyl esters (FAMEs) were separated, identified and quantified by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) using the method already described by Adam et al., 2012.

3. Results and discussion

3.1 Recovery of Crude lipids

The measurement of lipids recovery was based on the total amount of FAMEs in each sample. So it is a real yield in total fatty acids, and it is certainly a much more accurate value than a yield obtained by gravimetric method. Table 1 shows the results of both microalgae for each extraction method. Three extraction methods, B&D, SDEP and Sox were tested with different solvents. Use of B&D extraction is the commonly accepted method for lipid extraction from biological tissues due to its high lipid yields (Certik et al., n.d.). Therefore, the B&D method was selected as standard to compare other extraction technique. As mentioned in Table 1, B&D method yielded 23.78% and 4.03% lipids content for *N. oculata* and *D. salina* respectively. Crude lipids of *N. oculata* and *D. salina* obtained by SDEP procedure with three terpenes were higher than Sox and slightly lower than B&D reference method. First, these results can be explained by the difference of polarity between solvents; Liu and Mamidipally (Liu and Mamidipally, 2005; Mamidipally and Liu, 2004) have already noted this effect that might be due to the slightly more polar nature of terpenes and much more polar nature of methanol/chloroforme mixture compared with *n-hexane*. In addition, in SDEP procedure the matrix is in direct contact with the boiling solvent which is not the case

with the conventional Soxhlet. A higher dissolving ability of terpenes for lipids might also be pointed out by the higher temperature used to boil this solvent which could produce a lower viscosity of the analytes in the matrix and, accordingly, a better diffusion rate of the solute from the solid phase to the solvent.

Table 1: Crude lipids, distribution of lipid class and fatty acid composition of extracts obtained by different extraction methods. (PUFAs polyunsaturated fatty acids, MUFAs monounsaturated fatty acids, SFAs Saturated fatty acids)

	<i>N. oculata</i>										<i>D. salina</i>									
	B&D		SDEP		α-pinene		p-cymene		Sox		B&D		SDEP		α-pinene		p-cymene		Sox	
Lipids Yield (%)	23.78	±2.13	18.73	±6.58	18.75	±3.01	21.45	±2.64	8.31	±1.05	4.03	±0.01	2.94	±0.02	3.29	±0.05	2.99	±0.01	1.90	±0.03
Lipid class composition																				
FFA : Free fatty acid	20.21	±0.03	27.12	±0.12	23.42	±0.27	25.84	±0.32	16.92	±0.13	40.64	±0.36	49.77	±0.08	47.55	±0.32	42.95	±0.01	45.25	±0.09
TAG : Triacylglycerol	69.94	±0.16	61.18	±0.05	57.67	±0.65	62.02	±0.82	67.30	±2.68	59.36	±0.02	50.23	±0.20	52.45	±0.05	57.05	±0.24	54.75	±0.04
DAG: Diacylglycerol	9.85	±0.06	11.71	±0.06	18.91	±0.09	12.15	±0.15	15.78	±0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fatty acids composition																				
Saturated																				
C14:0	1.20	±0.02	1.52	±0.03	1.43	±0.01	0.72	±0.97	1.37	±0.10	3.37	±0.45	6.74	±0.17	3.69	±0.02	3.61	±0.01	1.01	±0.03
C16:0	20.65	±0.09	21.86	±0.41	21.90	±0.01	21.69	±0.03	21.55	±0.28	46.46	±0.31	34.84	±1.05	43.36	±0.15	42.66	±0.06	38.67	±1.65
C18:0	1.62	±0.05	1.84	±0.11	1.75	±0.01	1.88	±0.09	1.72	±0.01	1.26	±0.04	3.13	±0.06	1.01	±0.03	1.17	±0.02	0.81	±0.07
Mono-unsaturated																				
C14:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.43	±0.01	2.02	±0.02	0.60	±0.01	0.48	±0.02	0.19	±0.02
C16:1(n-9)	1.07	±0.01	1.25	±0.05	1.12	±0.01	1.10	±0.01	1.13	±0.02	0.69	±0.09	0.94	±0.09	0.91	±0.01	0.58	±0.01	1.52	±0.58
C16:1(n-7)	2.76	±0.02	3.26	±0.01	3.11	±0.01	3.12	±0.05	2.83	±0.11	0.54	±0.01	1.88	±0.34	0.89	±0.01	0.52	±0.01	1.77	±0.24
C18:1(n-9)	27.46	±0.04	26.03	±0.02	26.27	±0.11	26.62	±0.73	26.87	±0.36	6.50	±0.14	12.61	±0.19	7.55	±0.03	7.67	±0.01	6.80	±0.27
C18:1(n-7)	2.78	±0.02	2.59	±0.24	2.52	±0.11	2.45	±0.15	2.35	±0.04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Poly-unsaturated																				
C16:2	2.46	±0.01	2.73	±0.13	2.48	±0.01	2.46	±0.03	2.53	±0.03	0.08	±0.01	2.42	±0.08	1.04	±0.01	0.91	±0.01	0.82	±0.06
C16:3	4.76	±0.03	4.84	±0.04	4.75	±0.03	4.74	±0.05	4.90	±0.07	1.18	±0.01	1.64	±0.06	0.37	±0.07	0.27	±0.01	0.91	±0.05
C16:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.22	±0.17	9.20	±0.03	9.16	±0.04	9.94	±0.01	8.37	±0.22
C18:2(n-6)	14.70	±0.01	14.91	±0.09	15.08	±0.03	15.50	±0.64	15.14	±0.20	6.95	±0.09	7.89	±0.99	7.98	±0.15	7.65	±0.17	8.60	±0.50
C18:3(n-3)	20.09	±0.07	19.18	±0.36	19.60	±0.01	19.73	±0.24	20.06	±0.32	20.32	±0.10	16.70	±0.10	23.44	±0.09	24.66	±0.05	30.54	±0.14
∑SFAs	23.47		25.22		25.08		24.28		24.64		51.09		44.71		48.06		47.44		40.49	
∑MUFAs	34.07		33.13		33.01		33.29		33.18		8.16		17.44		9.95		9.25		10.28	
∑PUFAs	42.01		41.66		41.90		42.43		42.62		37.75		37.85		41.99		43.43		49.24	

3.2 Lipids class composition

Similar to higher plants, microalgal lipids are composed of neutral lipids and polar lipids. Under nutrient stress conditions, many microalgae tend to accumulate neutral lipids (consist of triacylglycerols (TAG), diacylglycerols (DAG), monoacylglycerols (MAG) and free fatty acids (FFA)) and form lipid droplet localized in the cytoplasm as a storage form of carbon and energy. Neutral lipids of the extracts were separated using high-performance thin-layer chromatography (HP-TLC), quantified with densitometry and presented as % of lipid class in total lipids extracted with B&D, SDEP and Sox for both microalgae. Four standards in a mixture of monoacylglycerol (MAG), diacylglycerol (DAG), triacylglycerol (TAG) and free fatty acids (C18) were deposited on the plate. For *N. oculata*, HP-TLC results confirm that TAG, DAG and FFA were the main components of the extracted lipids, but they contributed to the total lipid content in different amounts. As shown in Fig.2, TAG made up an important percentage of total lipids (between 57 and 69% according to extraction method). Regarding *D.salina*, the amount of TAG for B&D method is about 60%, 54% for Sox and ranging from 50 to 57% for SDEP procedures. The SDEP procedure with p-cymene solvent gives a higher quantity of TAG than d-limonene and α -pinene. Results obtained with the SDEP method including different terpene were almost similar with those obtained by both conventional Sox and B&D method.

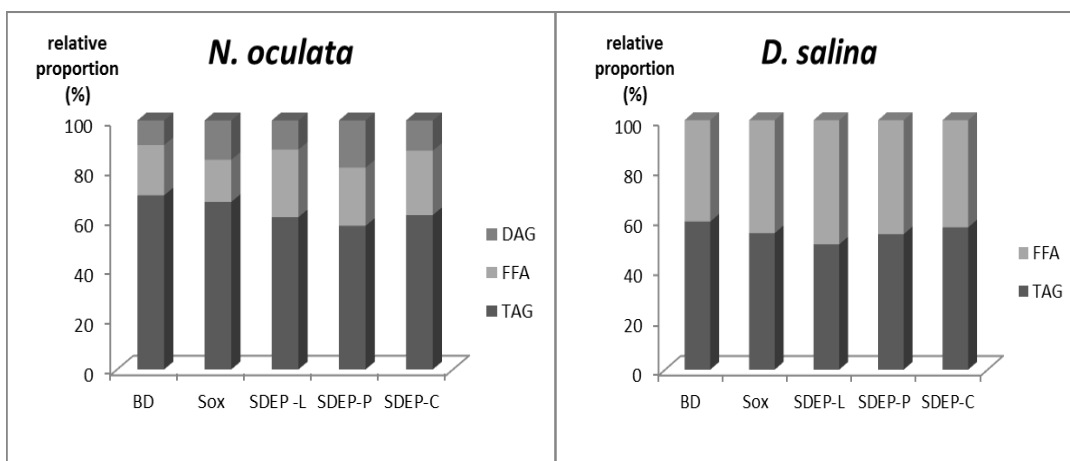


Figure 2. Distribution of lipid classes by HP-TLC

3.3 Fatty acid compositions

Table 1 shows the classes' variability of FAMES in connection with the extraction method used. The nature of FAMES composition in *N.oculata* and *D. salina* was determined by GC

analysis. According to Table 1, the main fatty acids for *N. oculata* were palmitic (C16:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids. These four fatty acids represent more than 80% of the total fatty acid composition of the extracted oil. Other fatty acids such as myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1), palmitolenic (C16:2), hirigonic (C16:3) or stearic (C18:0) acids were also noted with a less predominant peak area. Arachidic (C20:0) and behenic (C22:0) acids were found in trace levels. No significant differences were detected according different extraction methods and solvents. The fatty acid composition of *N. oculata* sp. displayed in Table 1 is different to the profile presented by Adam et al. (Adam et al., 2012). Despite similar results regarding the respective proportions of C16:0 and C14:0, the authors report *N. oculata* to contain particularly high levels of C16:1 and C25:3, with corresponding reduction in C18:1, C18:2 and C18:3. Fatty acid profile of microalgal species is known to be function of its culturing conditions and environmental conditions (Olofsson et al., 2012). For *D. salina* sp., palmitic (C16:0), oleic (C18:1n9), hexadecatetraenoic (C16:4), linoleic (C18:2) and linolenic (C18:3) acids were identified as the principal fatty acids in *D. salina* extracted lipids. The data in table reveals that total unsaturated fatty acids were about 45-60%, while saturated fatty acids were about 40-50%. Results obtained with SDEP method were almost similar with those obtained by both conventional Sox extraction and B&D method. The sum percentages of saturated, mono- and poly-unsaturated fatty acids were in line with those of several tables dealing with the fatty acid composition of *N. oculata* and *D. salina* oil found in literature. As a conclusion, it can be said that the proportion of the different fatty acids as well as the proportion of SFAs, PUFAs, or MUFAs has not been affected by the unusual conditions used in our experiment, in other words, the use of terpenes as solvent do not involve extraneous effects and/or artefacts on the composition of the lipids extracted.

3.4 Energy consumption

We conducted a comparison on energy consumption of SDEP process and the current method to extract lipids, Soxhlet. Alternatively, the input power consumption was monitored using a separate Wattmeter at the entrance of electrical heater power supply (i.e. at the entrance of electrical heater, rotary evaporator and cooler power supply). For Soxhlet extraction, drying biomass is required. So, in our calculation we have taken into account the freeze-drying of microalgae for 48h. We have added the energy consumption of all apparatus involved in each extraction technique. The energy requirement to perform the extraction, based on the power

consumptions for 1g of extracted lipids, was 8.84 kWh for Soxhlet while this value was 2.15 kWh for SDEP. This indicates a substantial saving in the extraction cost by SDEP compared to the conventional extraction technique, Soxhlet.

4. Conclusion

The new procedure has undergone reproducible results in a substantially shorter time. The efficiency of SDEP is considerably higher than the conventional procedure in terms of lipid yield and if we take into account short distillation and extraction times required, cost and energy used of the process. This study has clearly demonstrated that this procedure can be used to extract lipid directly from wet microalgae with an extraction yield similar to that of the B&D method, with only minor variation in the fatty acids distribution.

Références Bibliographiques

A

Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F., **2012**. “Solvent-free” ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. *Bioresour. Technol.* *114*, 457–465.

Anastasakis, K., Ross, A.B., **2011**. Hydrothermal liquefaction of the brown macro-alga *Laminaria Saccharina*: Effect of reaction conditions on product distribution and composition. *Bioresour. Technol.* *102*, 4876–4883.

Andrich, G., Nesti, U., Venturi, F., Zinnai, A., Fiorentini, R., **2005**. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis sp.* *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *107*, 381–386.

B

Biller, P., Riley, R., Ross, A.B., **2011**. Catalytic hydrothermal processing of microalgae: Decomposition and upgrading of lipids. *Bioresour. Technol.* *102*, 4841–4848.

Biller, P., Ross, A.B., **2011**. Potential yields and properties of oil from the hydrothermal liquefaction of microalgae with different biochemical content. *Bioresour. Technol.* *102*, 215–225.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochem. Cell Biol.* *37*, 911–917.

C

Certik, M., Andrasi, P., Sajbidor, J., **1996**. Effect of extraction methods on lipid yield and fatty acid composition of lipid classes containing γ -linolenic acid extracted from fungi. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *73*, 357–365.

Cheng, C.-H., Du, T.-B., Pi, H.-C., Jang, S.-M., Lin, Y.-H., Lee, H.-T., **2011**. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresour. Technol.* *102*, 10151–10153.

Cooney, M., Young, G., Nagle, N., **2009**. Extraction of Bio-oils from Microalgae. *Sep. Purif. Rev.* *38*, 291–325.

D

Demirbas, A., **2008**. Comparison of transesterification methods for production of biodiesel from vegetable oils and fats. *Energy Convers. Manag.* 49, 125–130.

F

F. Soxhlet, **1879**. *Dinglers Polyt J* 232, 461.

H

Halim, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., **2012**. Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review. *Biotechnol. Adv.*

L

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.-P., Bernard, O., **2009**. Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae. *Environ. Sci. Technol.* 43, 6475–6481.

Liu, S.X., Mamidipally, P.K., **2005**. Quality Comparison of Rice Bran Oil Extracted with d-Limonene and N-hexane. *Cereal Chem.* 82, 209–215.

M

Mamidipally, P.K., Liu, S.X., **2004**. First approach on rice bran oil extraction using limonene. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 122–125.

O

Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E., Bergé, J.P., del Pino, V., Uronen, P., Legrand, C., **2012**. Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. *Energies* 5, 1577–1592.

P

Patil, P.D., Gude, V.G., Mannarswamy, A., Cooke, P., Munson-McGee, S., Nirmalakhandan, N., Lammers, P., Deng, S., **2011**. Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 102, 1399–1405.

Patil, P.D., Gude, V.G., Mannarswamy, A., Deng, S., Cooke, P., Munson-McGee, S., Rhodes, I., Lammers, P., Nirmalakhandan, N., **2011**. Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions. *Bioresour. Technol.* 102, 118–122.

S

Singh, J., Gu, S., **2010**. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14, 2596–2610.

V

Virost, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F., **2008**. Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination: Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave Clevenger distillation. *J. Chromatogr. A* 1196-1197, 147–152.

Chapitre V. Intensification par les micro-ondes de l'extraction des lipides à partir de biomasse fraîche

La réduction du temps d'un procédé est un enjeu majeur pour les industriels. La rapidité d'un procédé entraîne un gain énergétique et une diminution du coût. Les extractions longues comme le Soxhlet (8h) ou dans une moindre mesure le SDEP (2h) sont très gourmandes en énergie (donc beaucoup de CO₂ dégagé) ; une intensification du procédé permettrait de réduire l'impact environnemental. C'est dans ce sens que nous avons voulu substituer le mode de chauffage conventionnel par un chauffage micro-ondes. Les avantages bien connus du chauffage par micro-ondes (reproductibilité du traitement, absence inertie) et l'expérience du laboratoire GREEN pour cette technologie ont conduits à retenir cette technique pour nos essais. Le chapitre 5 présentera les résultats de l'extraction des lipides à partir de biomasse micro-algale humide par un solvant terpénique, assistée par micro-ondes. Les deux chapitres précédents ont montré la possibilité d'extraire les lipides de micro-algues par des solvants terpéniques comme le d-limonène, l' α -pinène et le p-cymène sur biomasse sèche comme sur biomasse humide. Afin d'optimiser l'extraction des lipides en termes de rendements et de temps d'extraction, l'extraction des lipides sera ici intensifiée par les micro-ondes.

V.1. Le chauffage micro-ondes vs chauffage conventionnel

Les micro-ondes désignent les radiations non-ionisantes comprises dans le spectre électromagnétique des hyperfréquences et ayant une longueur d'onde comprise entre l'infrarouge et les ondes radio (FigureV-1). L'utilisation de ces ondes peut être discriminée en deux catégories distinctes selon la fonction ou la situation requise : l'onde peut être porteuse d'informations comme dans les télécommunications (téléphones portables, satellites, GPS, radars...) ou vecteur d'énergie (chauffage, décongélation, séchage, cuisson...) grâce à la friction, aux chocs, et à l'agitation moléculaire produite par la migration des ions et la rotation dipolaire. Cette application thermique est à ce jour largement utilisée dans l'industrie et les foyers domestiques, mais a cependant nécessité de nombreuses années avant d'être vulgarisée et utilisée par le grand public.

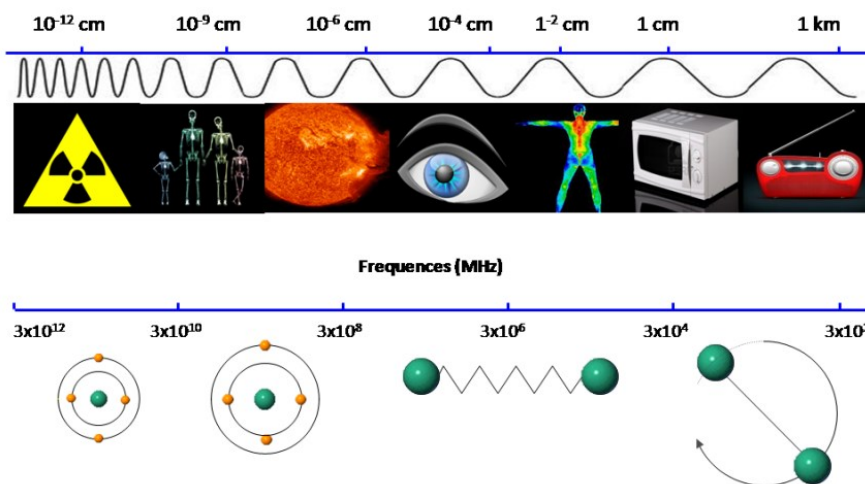


Figure V-1: Le spectre électromagnétique

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose essentiellement sur le phénomène de rotation dipolaire. Il est lié au mouvement rotatif alternatif de molécules possédant un moment dipolaire qui tentent de s'aligner avec le champ électrique. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif, les dipôles s'orientent dans un sens, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens lors du renversement de la polarité du champ. L'énergie électrique fournie au milieu est convertie en énergie cinétique par la rotation des dipôles.

L'alignement des dipôles est retardé par la présence d'interactions (liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals) qui vont provoquer une friction moléculaire comparable à des frottements solide-solide. La somme de ces chocs moléculaires, rotations dipolaires et frictions moléculaires vont induire un dégagement de chaleur dans le milieu étudié. Ce dégagement de chaleur sera d'autant plus fort si la fréquence du champ électrique se trouve être égale à la fréquence de relaxation moléculaire. Lorsque soumis à des fréquences trop hautes ou trop faibles, l'ensemble des dipôles ne peut être en phase avec le champ créé. Cela se traduit par une production énergétique trop faible pour être efficace. A 2,45 GHz, le changement de sens du champ électrique excitateur contraint les molécules d'eau à se retourner $4,9 \cdot 10^9$ fois par seconde. Cette donnée traduit un changement d'état extrêmement rapide, on dit alors des dipôles qu'ils frissonnent.

La plupart des expérimentations sont accomplies à l'aide d'un chauffage conventionnel par conduction thermique, à l'aide de différents types d'appareillage : des plaques chauffantes, des résistances, des fours à convection, des flammes, une circulation d'eau chaude, de la vapeur... Ce type de chauffage est souvent considéré comme limitant : les parois du récipient traité freinant le transfert de chaleur, la montée en température du milieu

peut être extrêmement lente et retarder significativement le processus. Le chauffage conventionnel induit un gradient de température allant de l'extérieur du récipient, vers l'intérieur. Pour les micro-ondes, l'agitation moléculaire est la source principale de production de chaleur. Ainsi, la matrice, le mélange ou le volume traité absorbe l'énergie directement et s'échauffe rapidement, devenant lui-même source de chaleur. Il s'agit d'un chauffage en volume et non en surface, les parois externes du récipient sont plus froides que le cœur de la solution. La présence d'un champ électromagnétique induit des gradients de température inversés par rapport à un chauffage électrique conventionnel. Des surchauffes locales peuvent apparaître dans le cadre de vitesse de réactions très rapides et créer des points chauds qui s'opposent aux phénomènes de convection observés dans un chauffage conventionnel. La Figure V-2 illustre les deux modes de chauffage.



Figure V-2 : Transferts thermiques selon les deux modes de chauffage

V.1.1. L'extraction assistée par micro-ondes

La capacité d'un solvant à s'échauffer sous un rayonnement micro-ondes et de transmettre la chaleur à d'autres molécules va dépendre de ses propriétés physico-chimiques et notamment du facteur de dissipation ($\tan \delta$) lié au facteur de perte diélectrique ou moment dipolaire (ϵ'') et à la constante diélectrique (ϵ') par la relation : $\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$. ϵ'' mesure la capacité à convertir l'énergie micro-onde en chaleur, et ϵ' correspond à la capacité des molécules à se polariser dans un champ électrique. Par conséquent, les solvants d'extraction les plus communément rencontrés en extraction assistée par micro-ondes sont ceux qui possèdent une constante diélectrique forte. C'est le cas des solvants polaires qui possèdent un dipôle permanent et qui vont donc fortement absorber les micro-ondes, contrairement aux solvants apolaires qui possèdent une constante diélectrique faible (Tableau V-1). Cependant, la sélectivité de l'extraction et la capacité du milieu à interagir avec les micro-ondes peuvent être modulées en utilisant des mélanges de solvants ou des solvants apolaires seuls. Dans certains cas, la matrice interagit elle-même avec les micro-ondes. Les micro-ondes irradient de manière sélective les composés polaires présents dans les différents types de tissus végétaux.

Tableau V-1 : Valeurs de constante diélectrique (ϵ') et du facteur de perte diélectrique (ϵ'') à 20°C

Solvant	Constante diélectrique (ϵ')	Perte diélectrique (ϵ'') (Debye)
n-hexane	1,89	< 0,1
Heptane	1,92	0
Dichlorométhane	8,9	1,14
2-propanol	19,9	1,66
Acétone	20,7	2,69
Ethanol	24,3	1,69
Méthanol	32,6	2,87
Acétonitrile	37,5	3,44
Eau	78,5	1,87

Ainsi l'expérimentateur désireux d'utiliser la technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes a le choix entre deux modes:

- Mode 1 : dans le cas de matrices fraîches ou sèches il est possible d'utiliser un solvant ou mélange de solvant possédant une forte constante diélectrique ou un mélange de solvant à faible et forte constante diélectrique. Dans ce cas, le solvant ou mélange de solvants ont une forte capacité à absorber les micro-ondes et donc s'échauffer, transmettant ainsi la chaleur à la matrice. Ce principe se rapproche de l'extraction

conventionnelle utilisant un chauffage par convection à la différence que le chauffage par micro-ondes est rapide, sans inertie et sans perte de chaleur.

- Mode 2 : dans le cas de matrices fraîches à forte teneur en eau (supérieure à 50%), l'extraction peut être réalisée sans solvant ou avec un solvant transparent aux micro-ondes. Dans ce cas, la matrice s'échauffera directement grâce à l'eau qu'elle renferme.

V.1.2. Description et fonctionnement du four à micro-ondes

Un four micro-ondes de laboratoire se compose de 5 parties différentes :

- un générateur de micro-ondes ou appelé magnétron qui va générer les micro-ondes à partir d'énergie électrique,
- un guide d'ondes qui propage les micro-ondes du magnétron vers l'échantillon à traiter,
- un réacteur transparent aux micro-ondes (verre ou téflon) dans lequel est disposé l'échantillon,
- une cavité ou four dans laquelle se trouve le réacteur,
- un système de contrôle de température, de puissance, de durée, etc....

L'application des micro-ondes peut être réalisée soit en monomode ou en multimode (Figure V-3) ; l'application des micro-ondes dite monomode est effective lorsque les dimensions géométriques permettent de conserver un seul mode de propagation de l'onde, qui est orienté par le guide d'onde. Ce type d'applicateur permet le contrôle précis du champ électrique mais est réservé au traitement de petits volumes ; celui-ci est alors placé dans le guide d'onde.

Dans une cavité multimode, les ondes électromagnétiques se réfléchissent sur les parois et se dispersent de manière aléatoire. Dans cette cavité, on peut traiter une quantité de produit plus grande que dans une cavité monomode, mais il est difficile de contrôler la distribution du champ et de forts gradients de température peuvent se développer dans le produit. Pour palier ce problème, la solution consiste à utiliser des brasseurs d'ondes ou des plateaux tournants (comme dans les fours ménagers).

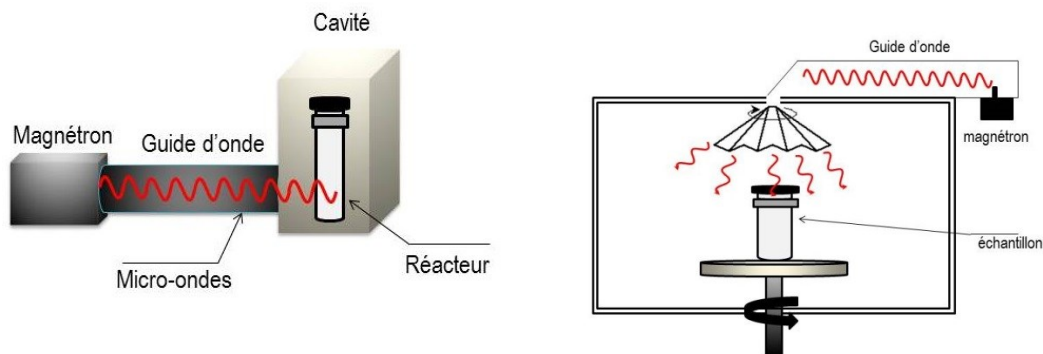


Figure V-3 : Schéma de fours à micro-ondes monomode (gauche) et multimode (droite)

L'objectif de ce chapitre est d'intensifier l'extraction des lipides à partir de pâte algale (80% d'eau) par les micro-ondes, afin d'obtenir voir d'augmenter des rendements obtenus avec l'extraction SDEP en chauffage conventionnel (chapitre 4) et de diminuer le temps d'extraction. L'extraction sera réalisée à l'aide du solvant terpénique ayant donné les meilleurs résultats en terme d'extraction des lipides totaux et des triglycérides dans les travaux antérieurs : le p-cymène. Une étude paramétrique permettra de déterminer la puissance micro-ondes optimale permettant d'extraire le maximum de lipides. *Dunaliella salina* sera la micro-algue utilisée pour cette étude. Une seconde étude sera axée sur l'efficacité des micro-ondes sur les parois cellulaires des micro-algues de différentes constitutions.

V.2. Résumé de l'article

Cet article, qui sera soumis prochainement, présente l'extraction des lipides de micro-algues fraîches à l'aide d'un solvant alternatif assisté par micro-ondes. Une étude paramétrique permet de déterminer la puissance optimale à appliquer afin d'obtenir les meilleures conditions d'extraction.

Cette étude est axée sur l'intensification du procédé SDEP (chapitre 4) par les micro-ondes. Les travaux sont réalisés sur deux espèces de micro-algues afin d'évaluer l'efficacité de cette technique assistée par les micro-ondes sur différents types de paroi cellulaire. L'objectif est d'obtenir des rendements lipidiques équivalents voir supérieurs au SDEP d'un point de vue qualitatif ou quantitatif. L'effet de la puissance micro-ondes est étudié, cette étude sera comparée aux différentes méthodes conventionnelles (Bligh and Dyer et Soxhlet) ainsi qu'au SDEP conventionnel. La figure V-6 détaille la démarche expérimentale suivie dans ce travail.

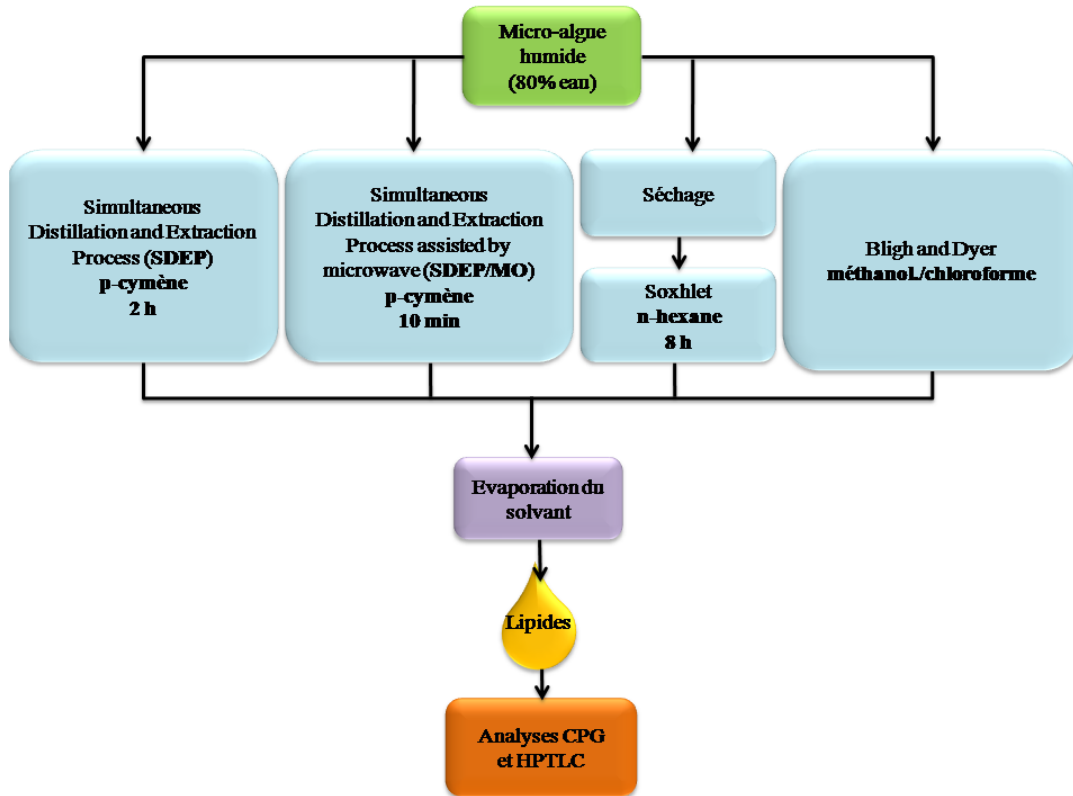


Figure V-4 : Démarche expérimentale

Dans un premier temps, des études préliminaires sur le comportement du solvant sous micro-ondes ont été réalisées. Le p-cymène est transparent aux micro-ondes, sa montée en température sous l'effet de l'énergie micro-ondes va se faire grâce à l'échauffement de l'eau contenue dans la pâte algale présente à 10% par rapport au p-cymène. L'ébullition du p-cymène est plus rapide (1 min) qu'avec le chauffage conventionnel (10 min). Le temps de séchage de la biomasse est également très rapide, de l'ordre de 3 à 4 min pour le chauffage micro-ondes en comparaison au chauffage conventionnel qui demande 40 min (Figure V-5). Afin de respecter les différentes phases du procédé SDEP, (1) chauffage du solvant et de la biomasse, (2) séchage de la biomasse et (3) extraction des lipides, le temps d'extraction total est estimé à 10 min avec 1 min pour le chauffage du mélange biomasse/solvant (ratio 1:10), 3 min pour le séchage de la biomasse et 6 min pour la phase d'extraction des lipides.

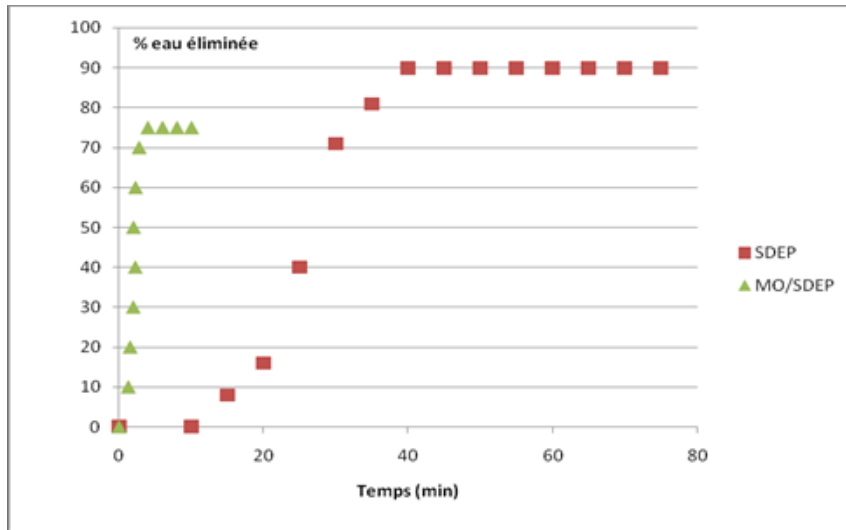


Figure V-5: Cinétique de l'eau éliminée issue de la pâte algale obtenue par distillation azéotropique avec le p-cymène

Différentes puissances micro-ondes ont été testées dans le but d'identifier l'optimum en termes d'extraction des lipides (de 200 à 900 W). Comme le montre la Figure V-6, un optimum a été trouvé à 400 W et ce rendement est très similaire à la méthode conventionnelle (Bligh and Dyer) ainsi qu'au SDEP conventionnel. L'examen de ces données permet de considérer la nouvelle procédure comme étant une intensification significative. Les rendements obtenus en terme de lipides extraits représentent 93% des lipides totaux (Bligh and Dyer) de la micro-algue, en seulement 10 min d'extraction contre 2 h pour le SDEP conventionnel.

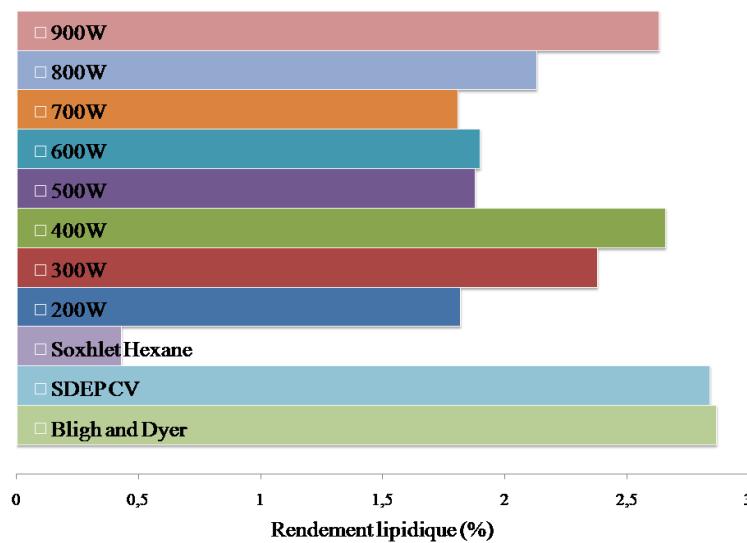


Figure V-6: Étude de la puissance micro-ondes

On observe néanmoins, que le rendement lipidique tend à augmenter pour une puissance de 900 W. Comme le montre la Figure V-7, pour des puissances de 900 et 400 W, l'eau contenue dans la biomasse est éliminée à environ 80% or pour une puissance de 700 W la totalité de l'eau est éliminée ce qui a pour conséquence de modifier les rendements lipidiques. Ces observations suggèrent l'hypothèse d'un mécanisme décrivant l'extraction des lipides (Figure V-8). Ce mécanisme se décrit par une destruction des parois de micro-algues liée à l'échauffement rapide de l'eau constitutive grâce au phénomène de rotation dipolaire. Cette augmentation brutale de la température à l'intérieur des cellules provoque par conséquent une augmentation de la pression. Sous l'effet de cette pression, les cellules "explorent" permettant ainsi l'accès au solvant environnant à l'intérieur de la cellule. L'eau joue donc un rôle primordiale dans le processus d'extraction, cependant si elle est présente de façon trop importante, la phase aqueuse crée une barrière à l'extraction des lipides comme observé pour une puissance à 200 W. En revanche, lorsque l'eau constitutive est complètement éliminée de la biomasse (700 W), les cellules vont être séchées très rapidement, ne permettant pas la diffusion du p-cymène à l'intérieur. Ainsi, un certain pourcentage d'eau, de l'ordre de 20%, est nécessaire au bon déroulement du processus d'extraction afin d'obtenir un rendement lipidique équivalent au SDEP conventionnel.

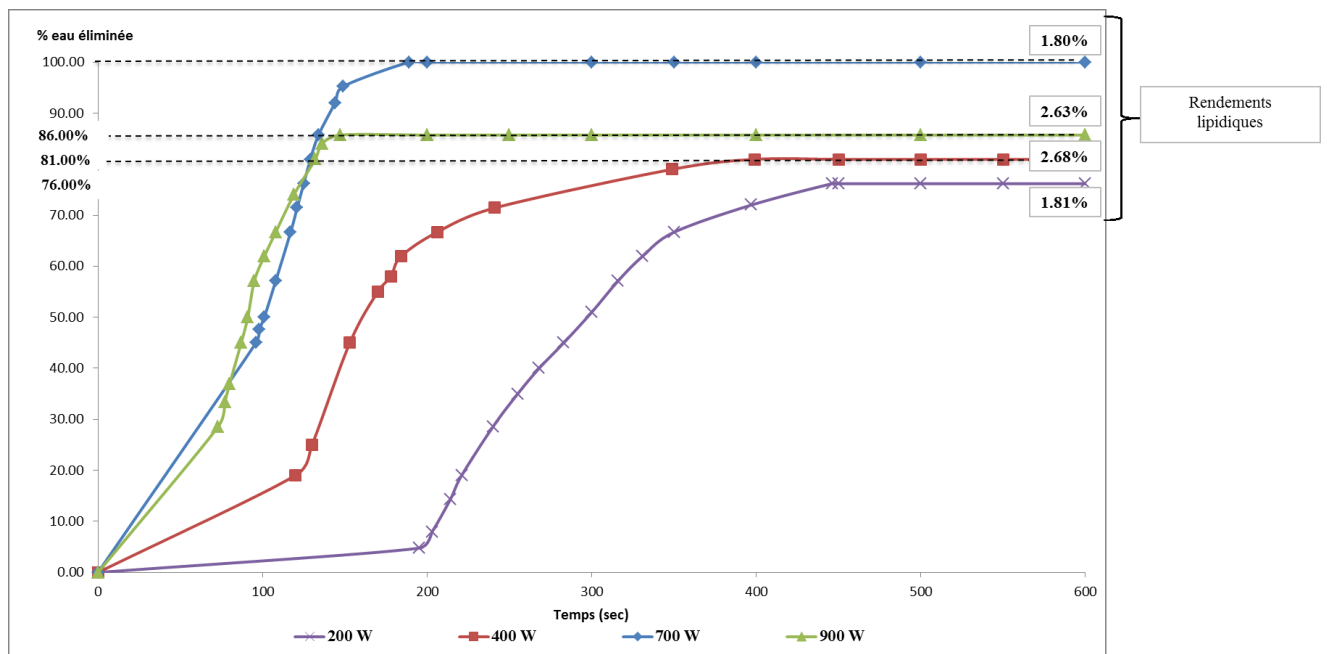


Figure V-7 : Cinétiques de séchage de la biomasse algale

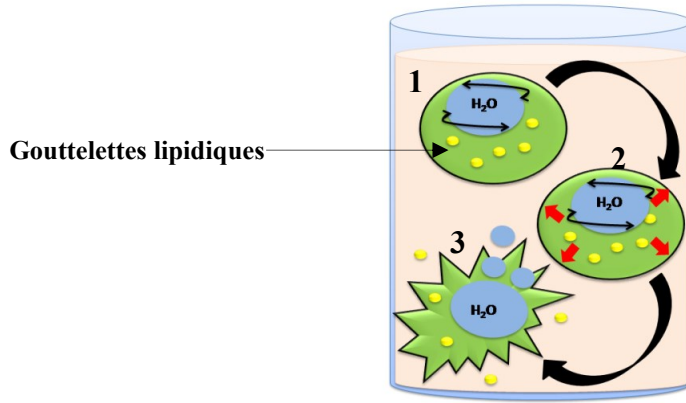


Figure V-8: Mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet micro-ondes, 1- Rotation dipolaire de l'eau, 2- Augmentation de la température et de la pression, 3- "Explosion" des cellules et libération du contenu cellulaire

Ainsi, la puissance de 400 W apparaît comme la puissance optimale dans les conditions opératoires définies (10 min, ratio 1/10 matrice/solvant). Concernant la répartition des classes de lipides, peu de différences ont été observées, les proportions de triglycérides oscillent entre 53 et 63 % pour 200 W et 400 W respectivement (Figure V-9). Parmi toutes les puissances testées, la puissance de 400 W permet d'extraire le maximum de triglycérides (63%) ; cette teneur se trouve supérieure au SDEP conventionnel (61 %) ainsi qu'à la méthode de référence de Bligh and Dyer (57 %). Le Soxhlet présente, malgré son rendement lipidique faible, une proportion de triglycérides plus importante que les autres méthodes. Ceci est dû à la polarité du n-hexane, phénomène précédemment expliqué dans le chapitre 3. En outre, il n'apparaît pas de fortes dégradations thermiques entre les différents extraits; les proportions d'acides gras libres restent plus ou moins similaires selon les différentes techniques et les différentes puissances appliquées.

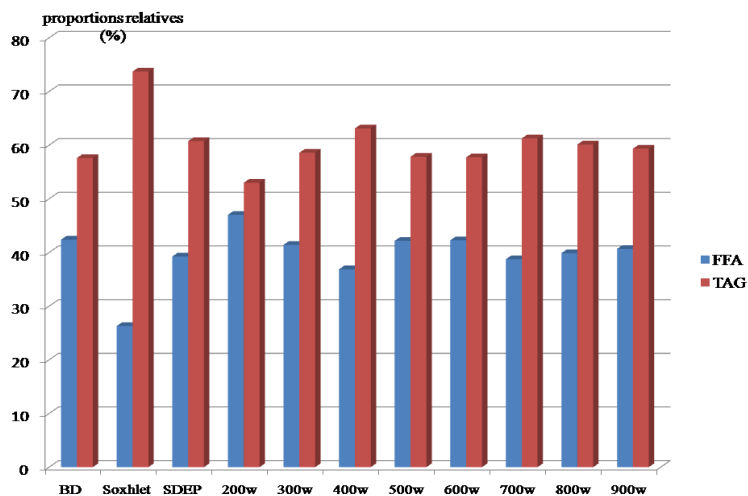


Figure V-9: Répartitions des classes de lipides des extraits pour les différentes puissances

Les profils d'acides gras des différents extraits sont relativement similaires. Les acides gras prédominants sont l'acide palmitique, C16:0 de 39,00 à 46,00%, l'acide hexadécatétraénoïque, C16:4 de 6,00 à 9,00 %, l'acide oléique, C18:1n9 de 6,00 à 8,00%, l'acide linoléique, C18:2n6 de 7,00 à 9,00% et l'acide linoléique, C18:3n3 de 21,00 à 34,00% (Figure V-10). On peut noter cependant une différence pour l'acide linoléique, C18:3n3 ; la méthode de Bligh and Dyer conduit à la proportion la plus élevée (34,00%) et le SDEP/MO (à 200 W) à la proportion la plus faible (21,00%). Cette différence peut s'expliquer par la sensibilité thermique des acides gras poly-insaturés (AGPI). En effet, les AGPI sont connus pour être des acides gras sensibles à la dégradation thermique de par leurs trois insaturations. A 200 W, l'élimination de l'eau de la biomasse est lente, ce qui augmente l'exposition de la biomasse aux micro-ondes et favorise ainsi la dégradation. Le Bligh and Dyer, réalisé à température ambiante, n'engendre pas d'altération.

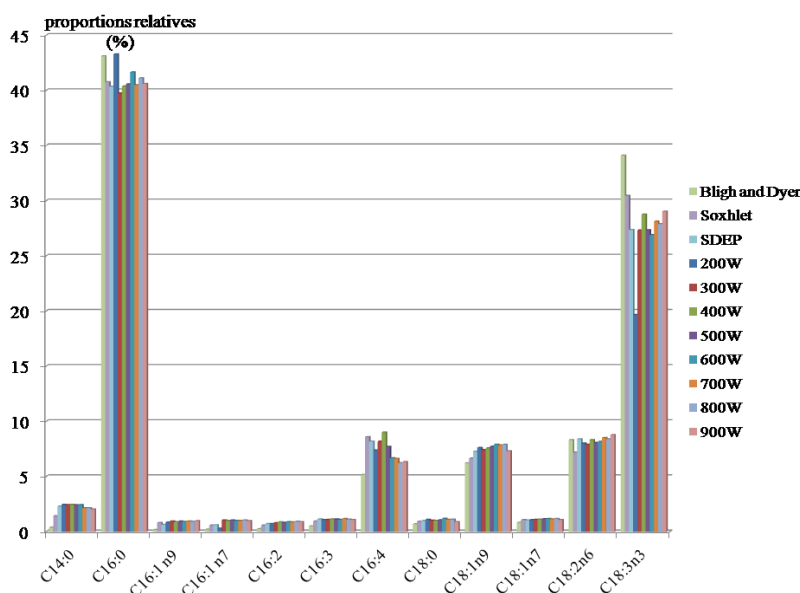


Figure V-10: Profils d'acides gras des extraits lipidiques pour les différentes puissances testées

La puissance d'extraction de 400 W a été choisie pour la suite des travaux. L'efficacité de cette intensification micro-onde a été évaluée sur une autre espèce de micro-algues possédant une paroi différente, *Nannochloropsis oculata*. C'est une micro-algue connue pour ses taux élevés en triglycérides et possédant une paroi dite « résistante » (Duong et al., 2012; Pulz, 2001).

L'espèce *Dunaliella salina* préalablement étudiée a été prise pour référence dans la logique du projet Salinalgue. Rappelons que cette espèce est connue pour ne pas avoir de paroi (Michael A. Borowitzka, 1990).

Ainsi, *N. oculata* a été traitée par SDEP/MO avec les conditions optimales définies précédemment. Les extraits ont été comparés en termes de rendement lipidique, de répartition de classes de lipides et de composition en acides gras aux méthodes conventionnelles. Les résultats obtenus pour le rendement lipidique sont rapportés dans le Tableau V-2.

L'analyse de ces essais montre une certaine efficacité de la méthode mais ne conduit pas aux résultats obtenus précédemment avec *Dunaliella salina*. Ainsi cela montre que la structure des parois cellulaires a un impact non négligeable sur le rendement lipidique total. Ces essais constituent une étude préliminaire qui mériterait d'être approfondie en modulant la puissance et pourquoi pas en travaillant à une pression supérieure à la pression atmosphérique.

Tableau V-2 : Rendements lipidiques des différentes méthodes d'extraction à partir des deux espèces de micro-algues traitées

	Bligh and Dyer	SDEP Conventionnel	SDEP/MO
<i>Nannochloropsis oculata</i>	23.78	21.45	18.20
<i>Dunaliella salina</i>	2.86	2.82	2.68

L'analyse des classes de lipides a pu montrer des différences significatives entre les trois méthodes d'extraction pour une même espèce étudiée. On observe pour *N. oculata* une dégradation des triglycérides en diglycérides pour le SDEP et le SDEP/MO.

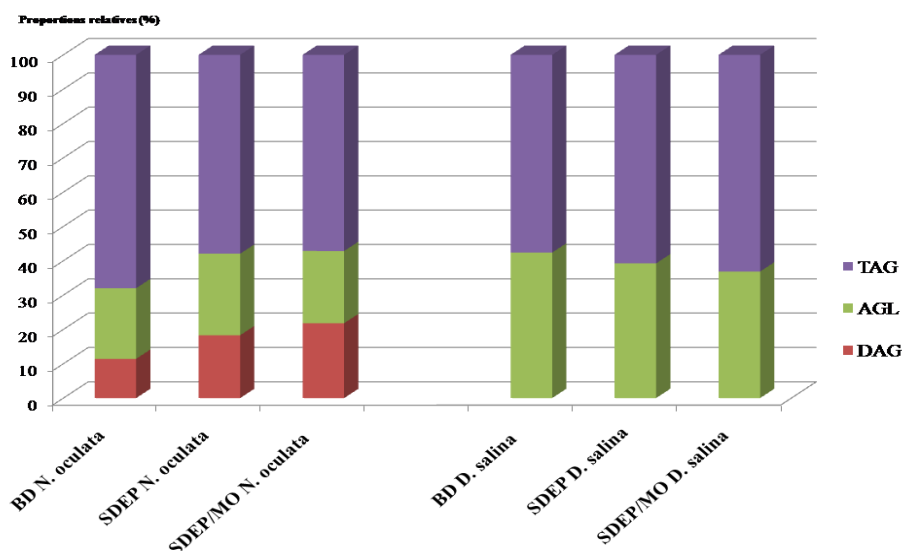


Figure V-11: Répartition des classes de lipides des extraits lipidiques des différentes espèces

L'analyse des acides gras a pu montrer, pour les deux espèces de micro-algues étudiées (Figure V-12, V-13) des profils d'acides gras équivalents quelle que soit la méthode

employée. La composition en acides saturés, mono- et poly-insaturés représente respectivement:

- 24%, 34% et 42% de la composition totale en acide gras de l'extrait de *N. oculata*

Ces résultats expérimentaux sont conformes à ceux trouvés dans la littérature (M. Chen et al., 2011; Olofsson et al., 2012). Ces conclusions nous permettent de souligner l'efficacité du SDEP assisté par micro-ondes pour l'extraction des lipides de micro-algues.

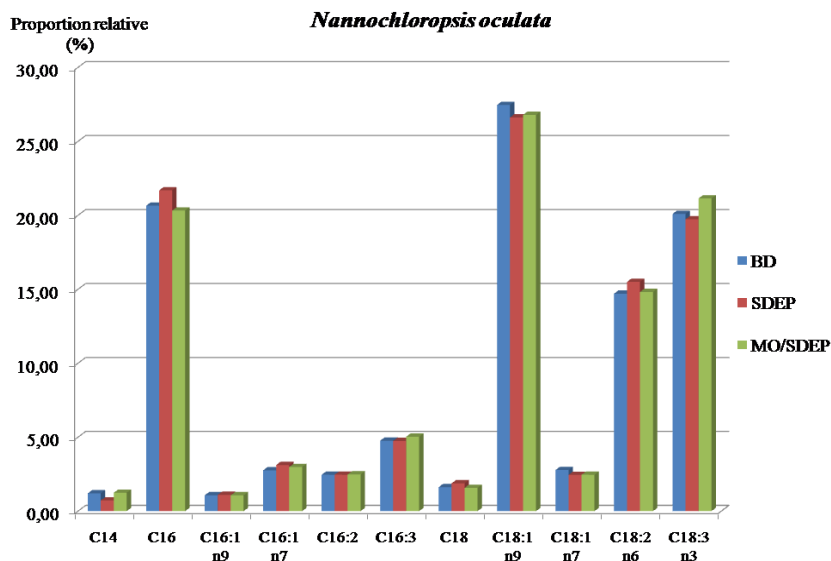


Figure V-12 : Profils d'acides gras des extraits lipidiques de *Nannochloropsis oculata*

Ce chapitre nous a permis d'évaluer la capacité du procédé SDEP assisté par micro-ondes à extraire les lipides dans différentes espèces de micro-algues. De plus, il a été mis en évidence que les paramètres et conditions expérimentales associées au SDEP assisté par micro-ondes n'avaient pas d'influence sur la composition des extraits lipidique, et n'affectaient pas la qualité des lipides extraits. Ces résultats impliquent la possibilité de moduler la puissance en fonction des espèces traitées. La compréhension des mécanismes d'extraction est encore à explorer, mais il apparaît que la méthode employée permet d'obtenir des résultats sensiblement équivalents, en termes de rendement et de qualité d'extrait, par rapport à la méthode conventionnelle.

V.3. Article

Abstract: In the search for less environmental impacting extraction methods for obtaining high quality lipids for biofuels production, Microwave-assisted Extraction (MAE) technique was employed combined to the new extraction method SDEP (Simultaneous Extraction and Distillation Process) to extract lipids from microalgae biomass. In this work, the effects of microwave power and heating time on the yield and quality of extracted lipids from microalgae were investigated. The optimized parameters were 10 min of extraction at 400 W, accounting for the highest yield of total lipids from *Dunaliella salina* (2.66 % w/w). In order to fully evaluate the effects of microwave on different cells and structures, the optimal conditions were applied to lipid extraction from *Nannochloropsis oculata*. The comparison between the new extraction method and Soxhlet extraction, Bligh and Dyer and conventional SDEP methods resulted in a higher or similar extraction rate. The technique shows great potential in reducing extraction time (10 min for 93% extraction rate) when compared to Soxhlet (8 hours for 14.63% extraction rate) and conventional SDEP extraction (2 hours for 94% extraction rate).

Keywords: Lipids, Extraction, Microwave-assisted Extraction, SDEP, Yield

1. Introduction

Biofuels have gained importance on the search for sustainable production of fossil-free energy. Among studied feedstocks, microalgae have shown great potential of obtaining high quality biofuel in large scale production, representing the highest yield biofuel crop (Ahmad et al., 2011). However, from a global approach of environmental impact analysis of biofuel production systems, the lipid extraction from the biomass represents the most energy consuming stage from all production chain. Therefore, the current challenge on biofuel production has become the search for less environmental impacting extraction methods in order to obtain a genuine green renewable source of energy.

A large number of lipid extraction procedures are available among conventional methods such as the Soxhlet (first developed for oleaginous seeds extraction), and the Bligh and Dyer method, which is specifically used for marine lipids extraction and still represents the standard method in this domain. However, some other innovative methods have been applied

to recover target molecules for biofuel production, such as supercritical CO₂, expelling and microwave-ultrasonic assisted extraction have also been reported (Cheng et al., 2011) in order to shorten the extraction time.

However, most of the novel extraction methods require dried microalgal biomass with less than 10% water content, which implies the use of a prior drying step that can easily become expensive and time consuming. That is the main reason why the SDEP method for lipid extraction from microalgae was developed. Nevertheless, the SDEP method requires a long time of extraction as a result of the heating system. In the domain of natural molecules extraction, microwave use has shown great potential, especially when applied to replace conventional heating in standard procedures. A number of process intensification studies have been published using microwave energy such as the microwave accelerated dean stark (Veillet et al., 2009), the ultrasound/microwave assisted extraction (Lianfu and Zelong, 2008) and others. Also, the modification of a conventional method requires fewer adaptation and investments on an already implemented production chain.

Therefore, a new method using microwave to assist the Simultaneous Distillation Extraction Process was developed and applied to another microalgae strain and optimized. The quality of the obtained extracts was analyzed and compared to three extractions methods.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Extraction solvent *p*-cymene was of analytical grade and was supplied by Sigma Co. (USA). All other organic solvents (methanol, sulfuric acid, NaCl, *n*-hexane, chloroform, methyl acetate, acetic acid, isopropanol, diethyl ether and KCl) used for the preparation of fatty acid derivatives and HPTLC analysis were of analytical grade and were purchased from VWR International. Various glassware and SDEP apparatus used in extraction procedures and fatty acid methyl ester preparations were supplied by Legallais (Montferrier-sur-Lez, France).

2.2. Microalgae cultivation and harvesting

Two microalgae strains (*Dunaliella salina*, *Nannochloropsis oculata*,) were purchased from the Greensea Company (Meze, France). The *Dunaliella salina* strain used in this work is a sauvage strain that was grown in natural conditions, in a salt marsh, at ambient temperature

with good sunniness under favourable conditions. *Nannochloropsis oculata* was incubated in tubular reactor at ambient temperature under deficiency conditions to obtain a high rate of lipids in the biomass. Each strain was harvested then centrifuged to have a microalgae paste at approximately 20% of dry weight. The biomass was frozen overnight at -20°C and slowly defrosted before each experiment.

2.3. Extraction of lipids

2.3.1 Determination of the total lipid content

The total lipid content in the all microalgae species was determined by using chloroform-methanol (2:1 v/v) according to Bligh and Dyer method (1957)(Bligh and Dyer, 1959). The mixture was agitated during 15 min in an orbital shaker at room temperature. The lipid fraction was then separated and the solvent evaporated under a nitrogen stream. After gravimetry, the total lipid content was calculated as standard for further comparisons and expressed as percentage of dry weight.

2.3.3 Conventional SDEP apparatus and procedure

For SDEP extraction, 12 g ± 0.5 g with 20 % dry weight microalgae paste were placed into a 500 mL round-bottomed flask and dispersed using 100 mL of terpene solvent (*p*-cymene). A modified Dean stark receiver with a 3-way valve was added to the round-bottomed flask and fitted with a condenser (Figure 1).

The SDEP procedure (Dejoye Tanzi et al., 2013) allowed elimination of microalgae water, extraction of lipids and elimination of terpene solvent in a single “in situ” step. In the first step, most of the microalgae water was collected, giving place to the lipid extraction with terpene solvent in the second step and its subsequent elimination (by azeotropic distillation) in steps 3 and 4 by re-introducing water with the 3-way valve to form a binary water-terpene mixture. Terpene solvent was recovered from the water layer by phase separation in the modified Dean stark receiver and the extracted lipids were recovered from the water layer by phase separation in the distillation round-bottomed flask. Extractions were performed in triplicate and the mean values were reported. Lipid extracts were dried under a stream of N₂ and re-dispersed in solvent for HP-TLC or GC-FID analysis.

2.3.2 Simultaneous Distillation Extraction Process assisted by microwave (MW/SDEP)

The principle of the new process of SDEP assisted by microwaves is illustrated in Figure 2. Microwave-integrated SDEP was performed in a Milestone ETHOS (Milestone, Italy) microwave oven. The multi-mode microwave reactor has a twin magnetron (2 x 800 W, 2.45 GHz) with a maximum delivered power of 1000 W variable in 10 W increments. Time, temperature, pressure and power were controlled with the “easy WAVE” software package during experiments and the temperature was monitored by an infrared sensor outside the reactor. The flask, the amounts of microalgae and solvent volumes used were the same as the conventional SDEP technique. The solvent used for this study is the *p*-cymene, since it has been recognized as the terpene solvent which allows the best extraction of marine lipid amongst other terpene solvents such as limonene and pinene. In order to determine the range of power to be used, a screening process was performed by applying several ranges of power over 10 min. Each experiment was performed in triplicate and mean values were reported.

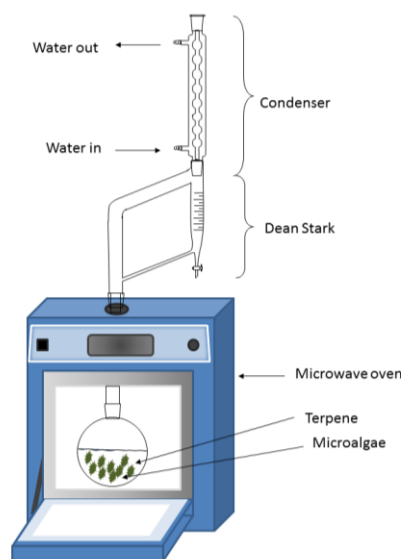


Figure 2. Simultaneous Distillation Extraction Process assisted by Microwave (MW/SDEP)

2.3.4 Soxhlet extraction apparatus and procedure

Since Soxhlet extraction is extensively employed in lipids extraction (F. Soxhlet, 1879) and is the reference methods for certain matrices, this technique was used on microalgae biomass in order to compare the yield and oil quality to the other used techniques. The cellulose thimble (30 mm x 80 mm) was weighed and filled with 10 grams of dry microalgae (Macherey-Nagel) and then placed in a Soxhlet apparatus. Lipids extraction was carried out over 8h using 300 mL of n-hexane. After the extraction, the major solvent contained in the

distillation flask was eliminated with a vacuum rotary evaporator. Extractions were performed in triplicate and the mean values were reported. Lipid extracts were dried under a stream of N₂ and re-suspended in solvent for HP-TLC or GC-FID analysis.

2.4 Generalization

To assess the efficiency of the MW/SDEP, another microalgae strain was studied using optimal conditions and results were compared to conventional SDEP, Soxhlet and Bligh and Dyer methods. After extraction, *Nannochloropsis oculata* was analyzed in order to assess the effects of microwave on the cell membrane. All experiments were performed in triplicate.

2.5. Lipid composition analysis

2.5.1 Qualitative and quantitative analysis of lipids classes (HPTLC)

Lipid classes in samples were determined by High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), using a double development chromatography to separate polar and neutral classes. Lipids were detected by charring and quantified using a CAMAG 3 TLC scanning densitometer (CAMAG, Muttenz, Switzerland) with identification of the classes against known polar and neutral lipid standards. Lipid extracts were loaded as a spot onto 20 x 10 cm Silica gel 60 F254 HPTLC plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) using an ATS 5 automatic TLC sampler (CAMAG, Switzerland) The HPTLC silica gel plates were developed with two mixed solvents in an ADC2 automatic developing chamber (CAMAG, Switzerland). The first eluent was a mixture of methyl acetate/isopropanol/chloroform/methanol/KCl (0.25% solution) in a ratio of 25:25:25:10:9 v/v/v/v/v running to a height of 5.5 cm from the origin. And the second eluent was a mixture of n-hexane/diethyl ether/glacial acetic acid in a ratio of 80:20:2 v/v/v to a height of 8.5 cm from the origin. After dried, the plate was dipped for 6 seconds in a modified CuSO₄ reagent (20 g CuSO₄, 200 ml methanol, 8 ml H₂SO₄, and 8 ml H₃PO₄), then heated at 141 °C for 30 min on a TLC plate heater and finally scanned using a TLC Scanner 3 with WinCATs software (CAMAG). Lipid classes were identified and quantified against those of corresponding lipid standards.

2.5.2 Preparation of fatty acids methyl ester (FAMEs)

FAMEs were prepared from the lipid extract using acid-catalyzed transesterification as described by Li et al (Li et al., 2006) . 1 ml methanolic sulfuric acid (5%) solution was added to a specific amount of extracted oil. Triheptadecanoin (C17:0 TAG) was used as internal standard. The mixture was then heated during 90 min at 85°C. After, the flask was removed from heat and 1.5 ml of sodium chloride (0.9%) solution and 1 ml of *n-hexane* were added. The flask was closed and shook vigorously during 30 seconds then centrifuged at 4000 rpm during 2 min. A small amount of the organic layer was recovered and transferred to a vial before being injected directly in a gas chromatograph for analysis.

2.5.3 FAMEs analysis

Fatty acids methyl esters were separated, identified and quantified by gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC/FID). Analyses were performed by using an Agilent (Kyoto, Japan) gas chromatograph. The instrument was equipped with a BD-EN14103 capillary column 30 m x 320 μm x 0.25 μm (Agilent) and the velocity of the carrier gas (He) was at 33 $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Injection of 2 μl of the various samples were carried out with a split mode (split ratio 1:20) and the injector temperature was set at 250 °C. Oven temperature was initially 50 °C for 1 min and then progressed at a rate of 20 °C/min from 50 °C to 180 °C and then increased from 180 °C to 220 °C at a rate of 2 °C/min. The temperature was then held at 230 °C over 10 min. FAMEs were identified by retention time and comparison with purified FAME standards (Sigma Co., USA).

3. Results and discussion

In this study, we focused on the potential of the new technique MW/SDEP, which combines the advantages of the conventional SDEP (water distillation and lipid extraction on a single step) and microwave heating (reduction of experiment time). Figure 3 shows a flowchart of the extractions that we were performed for this work.

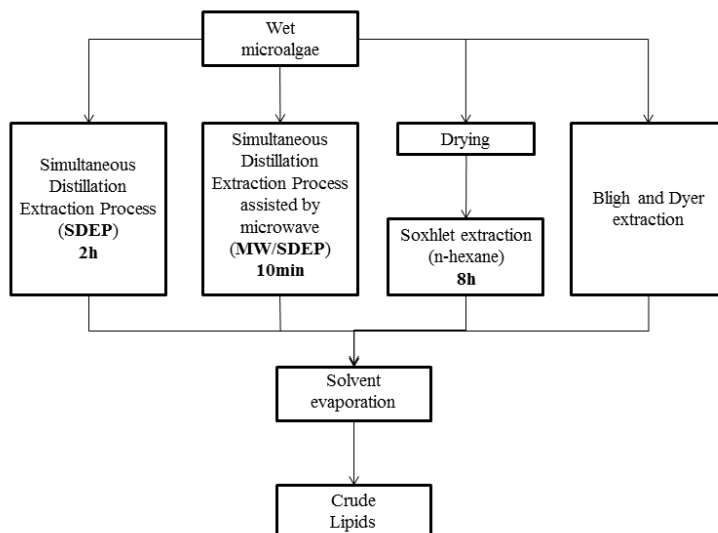


Figure 3. Diagram process

3.1 Azeotropic distillation kinetics

Although *p*-cymene presents a low dielectric constant (2.34 at 20°C), this solvent is not fully transparent to microwaves. The azeotropic distillation using MW/SDEP procedure can be divided in four different phases (Figure 4). The first phase corresponds to the induction time. During this period, the temperature of the mixture teperne-wet microalgae increased, even though water could not be recovered. Phase 2 corresponds to the azeotropic distillation of water and during this phase the water is easily removable from the biomass, which corresponds to the majority of microalgae water content (about 80%). During phase 3, the extraction rate is lower, since it corresponds to the extraction of intrinsic water, which is more difficult and takes longer to be removed from the microalgae paste. The lipid extraction starts when the majority of the water is extracted of the biomass. The last step (phase 4) corresponds to the end of water distillation and consequent lipid extraction, represented by a horizontal line on the graph. During this phase, there was no water left in the biomass and therefore *p*-cymene was the only remaining solvent.

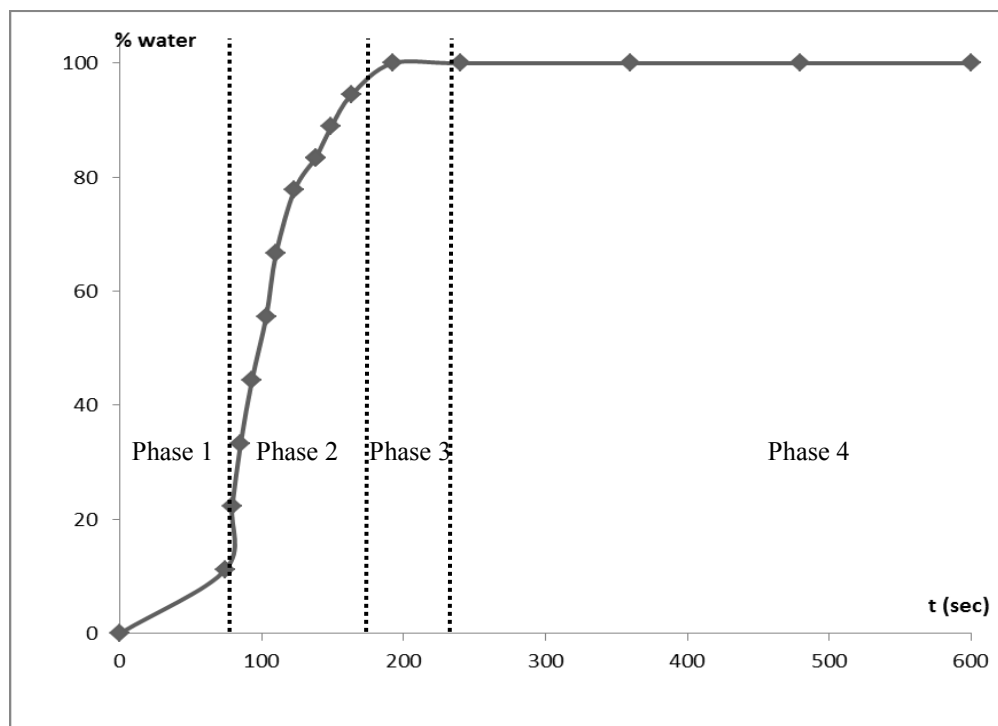


Figure 4. Distillation phases and water recovery as a function of time for MW/SDEP.

3.2 Optimization of Microwave Power

3.2.1 Yield Optimization

The high affinity between lipids and terpenes solvents allowed the extraction of lipids from wet matrix using the SDEP and SDEP/MW methods. The mean value found for lipid content was $2.82 \pm 0.03\%$ for the conventional SDEP, and the results from SDEP/MW were based on percentage of the total yield expected. Table 1 shows the ranges of power used on *Dunaliella salina* in order to determine the optimal microwave power for the MW/SDEP procedure (which was based on the lipid yield). In this table, the results from methods comparison between MW/SDEP, SDEP, Bligh and Dyer, and Soxhlet showed that the highest lipid extraction rates were obtained for SDEP and SDEP/MW (when compared to the Bligh and Dyer reference method) and the Soxhlet method provided the lowest lipid yield. These results for the Soxhlet extraction can be explained by the reduced diffusivity of n-hexane through the cell when compared to terpene solvent. The boiling point of terpenes are substantially higher than n-hexane, requiring a higher temperature during the Soxhlet extraction, which can result in a lower viscosity of the aim compounds (lipids) in the matrix and, in consequence, a better diffusion rate of the solutes from the solid phase to the solvent, resulting in the observed lower yield for the Soxhlet procedure.

Regarding conventional SDEP, this method is a time-consuming process (around 2 h) that relies on heat to increase the mass transfer rate from the outside to the inside of the sample matrix. On the other hand, microwave-assisted extraction is a fast extraction process (10 min) that relies on heat from the inside to the outside of the sample matrix, due to the fact that microwave energy can penetrate materials through molecular interaction. Concerning efficiency, the comparison of SDEP/MW with conventional SDEP shows in general that the lipid yields obtained by SDEP/MW were slightly lower than those provided by conventional SDEP and Bligh and Dyer. The lowest power used (100 W) did not allow lipid extraction neither water recovery, since the energy provide was not enough to create the azeotropic mixture required for lipid extraction. From 200 W to 400 W, the power applied was sufficient to extract lipids from the biomass and the lipid yield increased with the power. From 500 W to 900W, only 56% of the lipids contained in the microalgae paste were recovered, therefore this range of power showed less effectiveness for lipid extraction. Thus, 400 W was chosen as the optimal power to be applied in the SDEP/MW, since it resulted in the highest yield.

3.2.2 Extracts Composition

One of the main aspects of the study here developed was to check if the proposed approach produced degradation of the lipids by the actions of microwaves. With this purpose, the extracts obtained by both SDEP/MW and conventional methods (SDEP, Soxhlet and Bligh and Dyer) were subjected to several chromatographic analysis and few differences due to the extraction system were found.

From the High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) analysis, the lipids separation is show in the plate (Figure 5) and monoglycerides, diglycerides, free fatty acids, triglycerides and polar lipids were detected and quantified. The positions of the different glycerides after separation were determined from the relative distance of standards migration. The separation was based on the partition coefficients of the components of the reaction mixture. For all extracts, the distribution of the different lipid classes was obtained as a percentage of total detected areas in the densitometer. The monoglycerides and diglycerides were not found in the extracts; the results indicate that the majority of lipids are neutral, triacylglycerol and free fatty acids. The results of polar lipids quantification showed this class of compounds represents less than 0.1% of extracted lipids of *Dunaliella salina*. Although the TAG proportion is higher for Soxhlet extracts (due to the high affinity between TAG and n-hexane solvent), the lipid yield is strongly inferior when compared to the other methods

(Bligh and Dyer, SDEP and SDEP/MW) as shown in the Table 1. The comparison of quantified TAG measured by HPTLC/densitometry for the three remaining extraction methods (Bligh and Dyer, conventional SDEP and SDEP/MW) showed similar amounts for all three methods, although SDEP and SDEP/MW extracts presented a higher concentration in TAG than Bligh and Dyer extracts. In the power optimization for SDEP/MW, 400 W allowed the recovery of the highest TAG proportion.

The fatty acids composition of lipids extracted from *D. salina* using the four methods (Bligh and Dyer, Soxhlet n-hexane, SDEP, SDEP/MW) was determined using GC analysis (Table 1). In the lipids extracted from *D. salina*, palmitic (C16:0), oleic (C18:1n9), hexadecatetraenoic (C16:4), linoleic (C18:2n6) and alpha linolenic (C18:3n3) acids were commonly dominant. Fatty acids extracted by Bligh and Dyer, Soxhlet, conventional SDEP and SDEP/MW showed very similar profiles, although Bligh and Dyer method accounted for the highest amounts of PUFAs among the four methods. The lower PUFAs amount in the Soxhlet, conventional SDEP and SDEP/MW methods could be caused by slight degradation due to heating unlike Bligh and Dyer, which is a cold extraction method. The amounts of remaining fatty acids (oleic, linoleic and alpha linolenic acids) extracted by SDEP/MW were very similar to those extracted by SDEP method. The power optimization the lipid yield and profile of fatty acids, 400 W was the most efficient power to extract lipids from *D. salina*.

Table V-3 : Lipid yield, lipid classes composition and fatty acids composition in function of the microwave power

	Bligh and Dyer	Soxhlet	Conventional SDEP	MW/SDEP							
				200	300	400	500	600	700	800	900
Oil Yield (%)	2.86 ± 0.26	0.41 ± 0.03	2.82 ± 0.03	1.81 ± 0.50	2.38 ± 0.01	2.68 ± 0.03	1.88 ± 0.01	1.9 ± 0.03	1.80 ± 0.01	1.63 ± 0.01	1.08 ± 0.01
Lipid Classes Composition											
FFA	42.39 ± 0.03	26.29 ± 0.27	39.25 ± 0.12	47.01 ± 0.08	41.41 ± 0.19	36.87 ± 0.07	42.17 ± 0.03	42.27 ± 0.11	38.74 ± 0.40	39.88 ± 0.45	40.66 ± 0.10
TAG	57.61 ± 0.12	73.71 ± 0.09	60.75 ± 0.01	52.99 ± 0.20	58.59 ± 0.08	63.13 ± 0.36	57.83 ± 0.65	57.73 ± 0.04	61.26 ± 0.06	60.12 ± 0.04	59.34 ± 0.17
Fatty Acids Composition											
Saturated											
C14	0.39 ± 0.04	1.42 ± 0.14	2.33 ± 0.33	2.63 ± 0.03	2.47 ± 0.03	2.40 ± 0.07	2.41 ± 0.05	2.43 ± 0.01	2.15 ± 0.01	2.14 ± 0.08	2.04 ± 0.02
C16	43.10 ± 2.99	40.75 ± 0.51	40.76 ± 0.19	46.28 ± 0.45	40.14 ± 0.01	39.40 ± 0.06	40.57 ± 0.31	41.66 ± 0.02	40.49 ± 0.17	40.12 ± 0.14	40.61 ± 0.14
C18	0.70 ± 0.06	0.93 ± 0.12	1.01 ± 0.02	1.17 ± 0.06	1.02 ± 0.03	0.98 ± 0.02	1.06 ± 0.01	1.19 ± 0.01	1.10 ± 0.03	1.12 ± 0.01	0.88 ± 0.01
Mono-unsaturated											
C16:1 n9	0.18 ± 0.03	0.82 ± 0.26	0.64 ± 0.12	0.92 ± 0.24	0.96 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.93 ± 0.02	0.98 ± 0.01
C16:1 n7	0.22 ± 0.04	0.57 ± 0.50	0.62 ± 0.07	0.31 ± 0.17	1.05 ± 0.01	0.98 ± 0.01	1.05 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.05 ± 0.01	0.98 ± 0.01
C18:1 n9	6.22 ± 0.30	6.66 ± 0.13	7.35 ± 0.05	8.13 ± 0.19	7.50 ± 0.05	7.38 ± 0.04	7.72 ± 0.05	7.91 ± 0.01	7.84 ± 0.01	7.89 ± 0.01	7.30 ± 0.01
C18:1 n7	0.82 ± 0.53	1.08 ± 0.01	1.05 ± 0.01	1.14 ± 0.06	1.10 ± 0.06	1.08 ± 0.01	1.15 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.13 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.08 ± 0.01
Poly-unsaturated											
C16:2	0.25 ± 0.02	0.58 ± 0.08	0.72 ± 0.01	0.77 ± 0.08	0.81 ± 0.05	0.84 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.87 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.89 ± 0.01
C16:3	0.51 ± 0.01	0.95 ± 0.18	1.15 ± 0.01	1.15 ± 0.20	1.11 ± 0.01	1.11 ± 0.01	1.13 ± 0.01	1.09 ± 0.01	1.17 ± 0.01	1.12 ± 0.01	1.08 ± 0.01
C16:4	5.17 ± 0.57	8.58 ± 0.23	8.26 ± 0.05	7.79 ± 0.12	8.26 ± 0.02	8.79 ± 0.03	7.72 ± 0.60	6.67 ± 0.03	6.63 ± 0.04	6.23 ± 0.09	6.34 ± 0.15
C18:2 n6	8.32 ± 0.08	7.19 ± 0.52	8.48 ± 0.06	8.49 ± 0.64	7.98 ± 0.01	8.12 ± 0.02	8.06 ± 0.04	8.17 ± 0.01	8.52 ± 0.03	8.40 ± 0.01	8.77 ± 0.05
C18:3 n3	34.11 ± 3.60	30.47 ± 1.68	27.63 ± 0.10	21.21 ± 3.37	27.60 ± 0.02	28.05 ± 0.09	27.35 ± 0.13	26.91 ± 0.02	28.14 ± 0.28	27.91 ± 0.14	29.04 ± 0.01
ΣSFAs	44.19	43.10	44.10	50.08	43.63	42.78	44.04	45.28	43.74	44.38	43.53
ΣMUFAs	7.44	9.13	9.66	10.50	10.61	10.30	10.86	10.99	10.92	11.04	10.54
ΣPUFAs	49.36	47.77	46.24	39.41	45.76	46.91	45.08	43.72	45.33	44.58	46.12

FFA: Free Fatty Acids, TAG: Triacylglycerides, SFAs: Saturated Fatty Acids, MUFA: Mono-unsaturated Fatty Acids, PUFA: Poly-unsaturated Fatty Acids

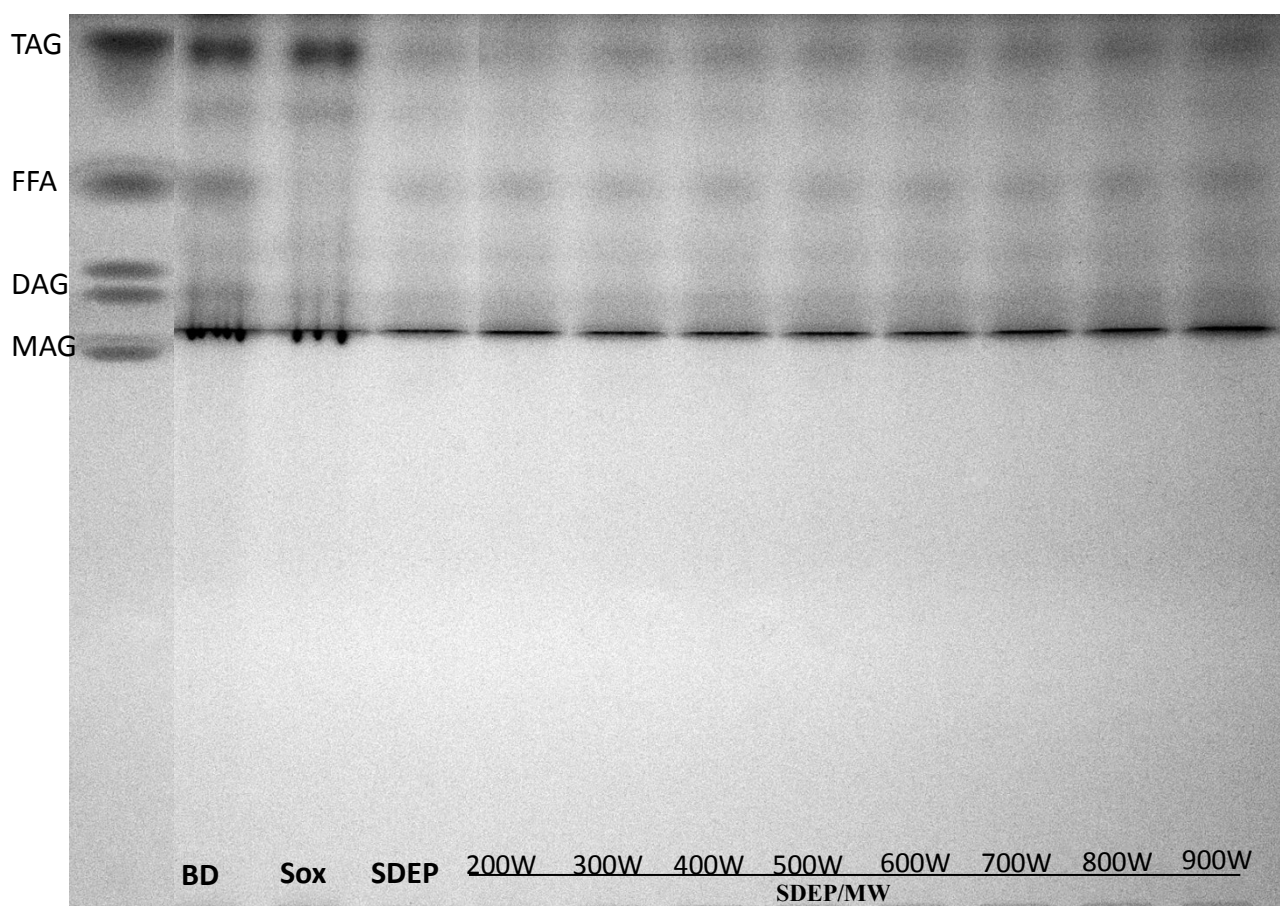


Figure 5: HPTLC plate where the different lipid classes detected can be visualized in extracts from Bligh and Dyer, Soxhlet, conventional SDEP and different ranges of power of SDEP/MW methods.

3.5. Generalization

Another microalgae strain with different cell wall compositions was used in order to assess the efficiency of new SDEP/MW process. Results are summarized in Table 2. *N. oculata* was chosen to represent microalgae, with a cell wall more resistant than *D. Salina*.

The comparison of lipid yields obtained from the three methods (Bligh and Dyer, SDEP and SDEP/MW) showed similar results for *N. oculata* (23.78%, 21.45% and 18.20%, respectively), and for *D. salina* (2.86%, 2.82% and 2.66%, respectively). Therefore, the cell wall composition will have a strong impact on the lipid yield, which can depend on the extraction method.

The qualitative lipids analysis showed that the fraction of polar compounds is inexistent in *D. salina* and *N. oculata* extracts. For *N. oculata*, the Bligh and Dyer method resulted in the highest proportion of TAG among the three methods, while SDEP and SDEP/MW resulted in similar TAG proportions (67.98%, 57.94% and 57.15%, respectively). In this case it is possible that TAG was degraded in DAG or FFA for SDEP and SDEP/MW. This

heterogeneity of results concerning TAG proportion between methods and microalgae strains might be due to degradation of TAG in DAG or FFA and, because of the differences between the strains, the fatty acids might have more or less affinity with the solvents (p-cymene, methanol and chloroform).

For quantification and fatty acids profile of different lipid extracts from the different techniques, fatty acids were converted into FAMES derivatives and analyzed by GC/FID. Identification was thus performed and the relative percentages in peak area of the compounds are presented. Table 2 reports the major identified fatty acids for the extraction of lipids from *N. oculata*. As observed in Table 2, in *N. oculata* strain, palmitic (C16), oleic (C18:1n9), linoleic (C18:2n6) and alpha linolenic (C18:3n3) acids relative percentage were the most predominant. The other compounds identified for this microalgae were myristic (C14:0), palmitoleic (C16:1n9 and n7), hexadecadienoic (C16:2), hexadecatrienoic (C16:3), stearic (C18:0) and oleic (C18:1n7) acids. All experimental results (Bligh and Dyer, SDEP and MW/SDEP) are in good agreement with the literature data for major fatty acids identification for *N. oculata* (M. Chen et al., 2011). The classification of the extracted compounds was here represented in three fractions: SFAs, MUFAs and PUFAs. The main SFAs quantified in extracts were myristic (C14:0) and palmitic (C16:0) acids. Only palmitoleic (C16:1n7) and oleic (C18:1n9) acids were obtained in the MUFA's fraction. The major PUFAs extracted were hexadecadienoic (C16:2), hexadecatrienoic (C16:3), linoleic (C18:2n6), arachidonic (C20:4n6) and eicosapentenoic (C20:5n6), acids. The comparison between extracts obtained using SDEP/MW, conventional SDEP and Bligh and Dyer methods showed the same compounds were extracted with an equivalent relative proportion, which is in good agreement with the literature.

Even though some differences were observed in terms of crude oil due to the high-resistance of cell walls, the SDEP/MW method showed a wide applicability, since it was suitable for lipid extraction in several microalgae strains. Concerning the application of this technique in different strains, the intrinsic differences in lipids composition and cell wall resistance should be evaluated and an optimization of microwave power should be performed for each microalgae strain. Therefore, this work shows the potential of this innovative technology using SDEP/MW, a more environmentally safer extraction procedure to be applied in the lipid extraction for biofuel production purposes, resulting in a high quality.

Table V-4 : Lipid extraction of two microalgae strains by conventional SDEP and MW/SDEP

	<i>D. salina</i>			<i>N. oculata</i>		
	BD	SDEP	MW/SDEP	BD	SDEP	MW/SDEP
Oil Yield (%)	2.86 ±0.26	2.82 ±0.03	2.66 ±0.03	23.78 ±2.13	21.45 ±2.64	18.20 ±0.28
Lipid class composition						
FFA	42.39 ±0.09	39.25 ±0.07	36.87 ±0.32	20.59 ±0.10	23.75 ±0.07	21.04 ±0.87
TAG	57.61 ±0.11	60.75 ±0.05	63.13 ±0.41	67.98 ±0.05	57.94 ±0.53	57.15 ±0.06
DAG	-	-	-	11.43 ±0.18	18.31 ±0.90	21.81 ±0.28
Other polar lipids	-	-	-	-	-	-
Fatty acids composition						
Saturated						
C14	0.39 ±0.04	2.31 ±0.03	2.40 ±0.07	1.20 ±0.02	0.72 ±0.97	1.24 ±0.01
C16	43.10 ±2.99	40.36 ±0.19	39.40 ±0.06	20.65 ±0.09	21.69 ±0.03	20.32 ±0.04
C18	0.70 ±0.06	0.99 ±0.02	0.98 ±0.02	1.62 ±0.05	1.88 ±0.09	1.57 ±0.01
Mono-unsaturated						
C15:1	-	-	-	-	-	-
C16:1 n9	0.18 ±0.03	0.63 ±0.12	0.86 ±0.01	1.07 ±0.01	1.10 ±0.01	1.07 ±0.01
C16:1 n7	0.22 ±0.04	0.61 ±0.07	0.98 ±0.01	2.76 ±0.02	3.12 ±0.05	2.98 ±0.01
C18:1 n9	6.22 ±0.30	7.27 ±0.05	7.38 ±0.04	27.46 ±0.04	26.62 ±0.73	26.79 ±0.01
C18:1 n7	0.82 ±0.53	1.04 ±0.01	1.08 ±0.01	2.78 ±0.02	2.45 ±0.15	2.46 ±0.09
Poly-unsaturated						
C16:2	0.25 ±0.02	0.72 ±0.01	0.84 ±0.01	2.46 ±0.01	2.46 ±0.03	2.48 ±0.04
C16:3	0.51 ±0.01	1.14 ±0.01	1.11 ±0.01	4.76 ±0.03	4.74 ±0.05	5.03 ±0.01
C16:4	5.17 ±0.57	8.18 ±0.06	8.78 ±0.03	-	-	-
C18:2 n6	8.32 ±0.08	8.40 ±0.06	8.12 ±0.02	14.70 ±0.01	15.50 ±0.64	14.82 ±0.07
C18:3 n3	34.11 ±3.60	27.36 ±0.10	28.05 ±0.09	20.09 ±0.07	19.73 ±0.24	21.14 ±0.01
C20:2 n6	-	-	-	-	-	-
C20:3 n6	-	-	-	-	-	-
C20:4 n6	-	-	-	-	-	-
C20:5 n6	-	-	-	-	-	-
ΣSFAs	44.19	43.66	42.78	23.47	24.29	23.13
ΣMUFAs	7.44	9.55	10.30	34.07	33.29	33.30
ΣPUFAs	48.36	45.80	46.90	42.01	42.43	43.47

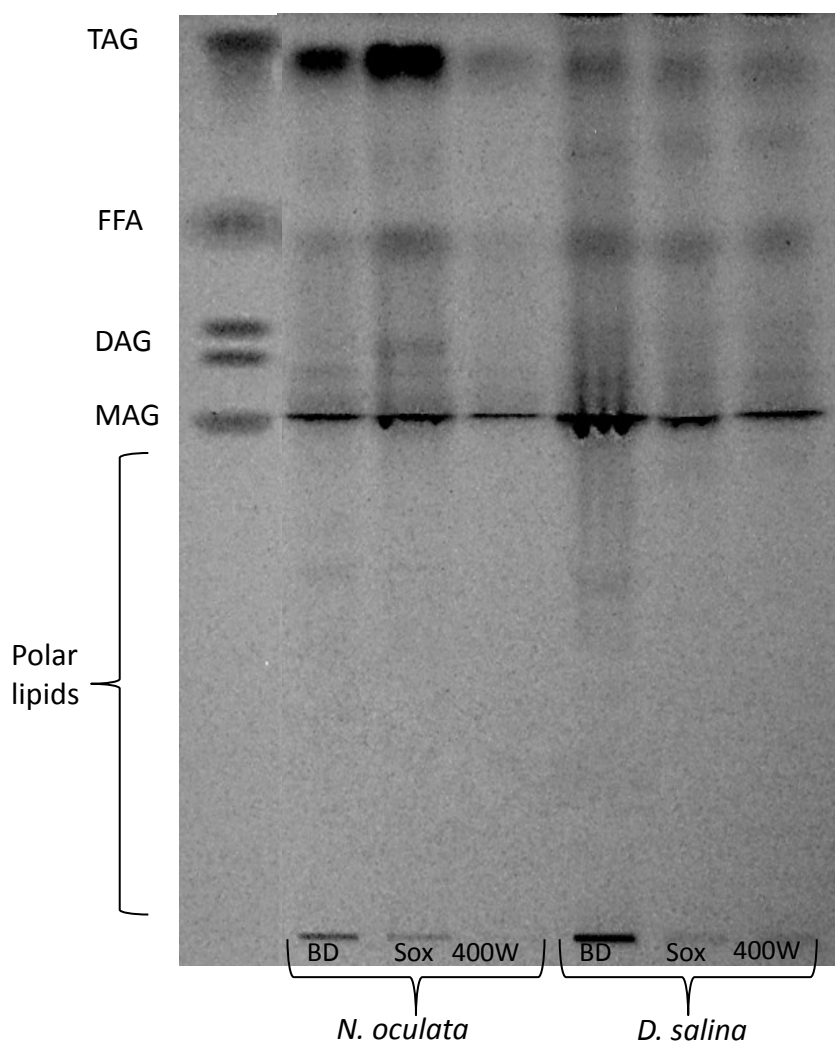


Figure 6: HPTLC plate where the different lipid classes detected of all extracts. TAG Triacylglycerol, FFA Free fatty acids, DAG Diacylglycerol, MAG Monoacylglycerol, BD Bligh and Dyer, Sox Soxhlet.

3.6 Cost, cleanliness, and safety considerations

SDEP/MW is proposed as an “environmentally friendly” extraction method suitable for lipid extraction from microalgae. The reduced cost of extraction is clearly advantageous for the proposed SDEP/MW method in terms of energy, solvent used and time. Conventional procedure required an extraction time of 8h for Soxhlet and 2h for SDEP. The SDEP/MW method required heating for 10 min only. The energy required to perform the two extraction methods are, respectively 8 kWh for Soxhlet (drying biomass, electrical energy for heating and evaporating), 1.05 kWh for conventional SDEP (for drying, heating and evaporating) and 0.6 kWh for SDEP/MW (electrical energy for microwave supply). The power consumption

was determined with a Wattmeter at the microwave generator entrance and the electrical heater power supply.

4. Conclusions

For the first time, heating with microwaves was used as an energy source for a rapid heating of the mixture solvent/ wet microalgae and in second time for lipid extraction with a SDEP apparatus. The validation of this new procedure has been checked by applying it to lipid extraction from microalgae. The new method has undergone reproducibility when optimal conditions were applied. The efficiency of this new technique SDEP/MW is considerably higher than conventional procedure Soxhlet or SDEP method if short extraction time required, cost and energy used and cleanliness of the process are taken into account. Therefore, SDEP/MW method could be appropriate for lipid extraction in a biodiesel purpose.

Références Bibliographiques

A

Ahmad, A.L., Yasin, N.H.M., Derek, C.J.C., Lim, J.K., **2011**. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15, 584–593.

Arad, S., Adda, M., Cohen, E., **1985**. The potential of production of sulfated polysaccharides from *Porphyridium*, in: Pasternak, D., Pietro, A.S. (Eds.), *Biosalinity in Action: Bioproduction with Saline Water, Developments in Plant and Soil Sciences*. Springer Netherlands, pp. 117–127.

B

Bligh, E.G., Dyer, W.J., **1959**. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Cell Biology* 37, 911–917.

Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., et al., **2008**. The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* 456, 239–244.

C

Chen, M., Chen, X., Liu, T., Zhang, W., **2011**. Subcritical Ethanol Extraction of Lipid from Wet Microalgae Paste of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 5, 385–389.

Cheng, C.-H., Du, T.-B., Pi, H.-C., Jang, S.-M., Lin, Y.-H., Lee, H.-T., **2011**. Comparative study of lipid extraction from microalgae by organic solvent and supercritical CO₂. *Bioresource Technology* 102, 10151–10153.

Crampon, C., Mouahid, A., Toudji, S.-A.A., Lépine, O., Badens, E., **2013**. Influence of pretreatment on supercritical CO₂ extraction from *Nannochloropsis oculata*. *The Journal of Supercritical Fluids* 79, 337–344.

D

Dejoye Tanzi, C., Abert Vian, M., Chemat, F., **2013**. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. *Bioresource Technology* 134, 271–275.

Duong, V.T., Li, Y., Nowak, E., Schenk, P.M., **2012**. Microalgae Isolation and Selection for Prospective Biodiesel Production. *Energies* 5, 1835–1849.

F

F. Soxhlet, **1879**. *Dinglers' Polyt. J.* 232, 461.

Fajardo, A.R., Cerdán, L.E., Medina, A.R., Fernández, F.G.A., Moreno, P.A.G., Grima, E.M., **2007**. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109, 120–126.

L

Li, Y., Beisson, F., Pollard, M., Ohlrogge, J., **2006**. Oil content of Arabidopsis seeds: The influence of seed anatomy, light and plant-to-plant variation. *Phytochemistry* 67, 904–915.

Lianfu, Z., Zelong, L., **2008**. Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrasonics Sonochemistry* 15, 731–737.

M

Mirón, A.S., García, M.C.C., Gómez, A.C., Camacho, F.G., Grima, E.M., Chisti, Y., **2003**. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 16, 287–297.

P

Pulz, O., **2001**. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 287–293.

V

Veillet, S., Tomao, V., Visinoni, F., Chemat, F., **2009**. New and rapid analytical procedure for water content determination: Microwave accelerated Dean–Stark. *Analytica Chimica Acta* 632, 203–207.

Z

Zhukova, N.V., Aizdaicher, N.A., **1995**. Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39, 351–356.

Conclusion générale et Perspectives

L'objectif de ce travail de thèse a été de mettre au point et de développer une technique d'extraction dite « verte » d'huile algale pour la production de biocarburant de nouvelle génération. Afin de répondre à cet objectif, trois démarches ont été fixées :

1. Montrer la capacité des solvants terpéniques à extraire les lipides marins à partir d'une biomasse sèche à l'aide d'une méthode existante,
2. Développer une technique d'extraction permettant l'extraction des lipides à l'aide de solvants terpéniques à partir d'une biomasse humide,
3. Intensifier et optimiser l'extraction des lipides sur une biomasse humide assistée par micro-ondes

En tout premier lieu, un état de l'art sur la filière micro-algues a été réalisé. Il a permis de mettre en évidence la biodiversité des micro-algues qui constitue un réel potentiel exploitable pour l'Industrie. Extrêmement riches en vitamines, lipides, protéines, sucres, pigments et antioxydants, elles sont aujourd'hui utilisées dans de nombreux secteurs (compléments alimentaires, cosmétiques, aquaculture, etc...). Grâce à leurs performances biologiques, elles devraient, dans un avenir proche, être au cœur des nouveaux projets énergétiques et environnementaux de la planète.

Cependant, cet état de l'art a également permis de mettre en évidence des lacunes dans cette filière et plus spécifiquement dans le domaine de l'extraction des lipides de micro-algues pour une application biocarburant. Les procédés d'extraction de lipides actuels demandent une consommation énergétique importante et ont souvent recours à des solvants pétrochimiques.

La première partie de ce travail (chapitre 3) a montré l'efficacité des solvants terpéniques pour l'extraction des lipides issus de micro-algues. La capacité de ces solvants a été testée vis-à-vis du n-hexane à l'aide d'une technique d'extraction de référence pour l'extraction des lipides: le Soxhlet. Ainsi, l'innovation de cette méthode repose sur le fait que l'extraction est réalisée avec des solvants « verts » en évitant l'utilisation de solvants organiques toxiques pour la santé humaine et l'environnement. L'efficacité de ces solvants alternatifs pour l'extraction des lipides provenant de *Chlorella vulgaris* sèche a pu être montrée avec des rendements lipidiques similaires au Soxhlet n-hexane. Cependant, en comparaison avec les résultats obtenus avec le « Bligh and Dyer » (méthode d'extraction des lipides marins de référence), les rendements lipidiques restent inférieurs autant pour les solvants terpéniques que pour le n-hexane avec des dégradations notamment au niveau des acides gras

polyinsaturés. Ainsi, la technique en elle-même et l'étape de séchage apparaît comme une étape limitante au niveau de la diffusion du solvant dans la cellule à partir d'une biomasse micro-algale.

Pour aller plus loin dans l'étude, la seconde partie de ce travail (chapitre 4) a consisté à mettre en œuvre une technique innovante d'extraction « verte » à partir d'une biomasse humide (sans séchage de la biomasse). Un appareillage de laboratoire nommé SDEP (Simultaneous Distillation and Extraction Process) a été développé, permettant d'extraire les lipides de la « pâte algale » (80% d'humidité) à l'aide de solvants terpéniques (d-limonène, α -pinène et p-cymène). Cette nouvelle méthode a été comparée tout au long de son évolution aux techniques conventionnelles d'extraction des lipides : le Soxhlet et la méthode Bligh and Dyer. Ce nouveau dispositif permet de porter à ébullition, le solvant terpénique en question ainsi que la pâte algale à plus de 80% d'humidité, et par distillation azéotropique de combiner la phase de séchage et la phase d'extraction des lipides. Cette méthode permet d'obtenir des résultats quantitativement (rendement en lipides) et qualitativement (répartition des classes de lipides et profils d'acides gras) équivalents au Bligh and Dyer. Ainsi, cette nouvelle technique a l'avantage de s'affranchir de l'étape préalable de séchage de la biomasse, d'obtenir des extraits lipidiques comparables au Bligh and Dyer mais également de combiner trois étapes (séchage, extraction et élimination du solvant) en un seul dispositif. Par ailleurs, elle met en jeu des agrosolvants, fabriqués à partir de matière première renouvelable, qui constituent une voie potentielle de substitution aux solvants d'origine pétrochimique. Cependant, cette nouvelle technique d'extraction requiert des temps de process (séchage, extraction, élimination du solvant) assez long de l'ordre de 2h.

Ainsi, pour la troisième et dernière partie de cette thèse (chapitre 5), l'intensification et l'optimisation de ce nouveau dispositif d'extraction (SDEP) à l'aide des micro-ondes a été développé. L'utilisation combinée de la température et de la puissance micro-ondes afin d'accélérer la diffusion du solvant dans les cellules et également la diffusion des lipides de la biomasse riche en eau vers l'extérieur (solvant environnant) a été étudiée. La méthode développée à partir du *Dunaliella salina* a été optimisée en établissant une étude de la puissance tout en gardant les mêmes proportions solvant/biomasse que pour le SDEP conventionnel. Avec une intensification par les micro-ondes du procédé, la durée d'extraction a pu être réduite à 10 min tout en atteignant des rendements lipidiques équivalents à ceux obtenus par chauffage conventionnel pendant 2h. Par ailleurs, les analyses CPG et HPTLC ont

montré que les micro-ondes ont peu modifié la composition en acides gras ainsi que la répartition des différentes classes de lipides dans les extraits et semblent avoir favorisé l'extraction des triglycérides par rapport au SDEP conventionnel.

Le SDEP assisté par micro-ondes permet donc une extraction des lipides de micro-algues simple, rapide et efficace. Le chauffage sélectif et volumétrique au cœur de la pâte algale apporté par les micro-ondes nous a permis d'exploiter un nouveau dispositif d'extraction à travers une énergie innovante et efficace. La technique permet de réduire considérablement les temps d'extraction sans altérer la composition des extraits. De plus, cette méthode fait un pas en direction des économies d'énergies et du développement durable : recyclage du solvant, diminution de la consommation énergétique et possibilité d'utiliser un solvant « vert ».

Les résultats obtenus pendant ce travail de thèse soulèvent plusieurs questions et donc certaines orientations futures de recherche :

1. Evaluer l'extraction SDEP assisté par micro-ondes à différents taux d'humidité de la biomasse afin de déterminer le seuil minimal et maximal d'humidité
2. Evaluer l'efficacité de l'extraction SDEP assisté par micro-ondes sur d'autres composés valorisables dans la micro-algue comme par exemple les pigments et notamment le β -carotène pour *D. salina*
3. Tester une technique de déstructuration cellulaire qui n'implique aucun chauffage de la biomasse comme les ultrasons en association avec un solvant terpénique (p-cymène meilleur candidat pour l'extraction des TAG) ou avec un autre solvant alternatif.

Tables des illustrations

Figure I-1 : Photographie d'une Cyanobactérie <i>Anabaena</i> (http://www.dr-ralf-wagner.de)	20
Figure I-2 : Schéma d'une structure de micro-algue unicellulaire	21
Figure I-3 : Photographie d'une Bacillariophycée <i>Navicula</i> (http://www.plancton-du-monde.org)	21
Figure I-4 : Photographie d'une Chlorophycée <i>Chlorella vulgaris</i> (http://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm)	22
Figure I-5 : Photographie d'une Chrysophycée <i>Dinobryon</i> (http://www.microscopy-uk.org.uk)	22
Figure I-6 : Photographie d'une Rhodophycée <i>Rhodorus marinus</i> (http://www.ecosociosystemes.fr)	23
Figure I-7 : Photographie d'une Euglenophycée <i>Euglena</i> (http://protist.i.hosei.ac.jp)	23
Figure I-8 : Structure chimique d'un TAG et d'un PL	25
Figure I-9 : Structures chimiques de DHA et EPA	26
Figure I-10 : Bassins de culture de micro-algues. A gauche : bassin en boucle fermée, infrastructure de Roswell, Nouveau Mexique (USA) (Weissman et al., 1988). A droite : bassins circulaires d'environ 500 m2, production de chlorelle (<i>Chlorella</i> Industries, Japon) (Lundquist et al., 2010)	27
Figure I-11 : Bassins construits dans le cadre du projet Salinalgue à Gruissan (Aude, France)	28
Figure I-12 : Photographies de différentes installations de PBR tubulaires. A gauche : PBR hélicoïdal, vertical Murdoch University, Australie (Chisti, 2007). A droite : PBR tubulaire horizontal immergé dans l'eau, Solix's Lumian™ Algae Growth System	29
Figure I-13 : Schéma de principe d'un PBR	29
Figure I-14 : Concept de production d'huile de micro-algues visant à obtenir du biodiesel	32
Figure I-15 : Représentation de la sphère de solubilité d'Hansen pour l'extraction des triglycérides	35
Figure I-16 : Les procédés de déstructuration cellulaire des micro-algues	38
Figure I-17 : Procédé "bead beating"	39
Figure I-18 : Diagramme d'équilibre de l'état supercritique	42
Figure I-19 : Schéma de principe d'une d'extraction par CO ₂ supercritique	43
Figure I-20 : Diagramme d'équilibre de l'état sub-critique	44
Figure I-21 : Schéma de principe d'une unité fonctionnant en mode statique	45
Figure I-22 : Les principales voies de valorisation des micro-algues	46
Figure I-23 : Culture de Spiruline au Burkina Faso	49
Figure I-24 : Différents pigments présents chez les micro-algues	50
Figure I-25 : <i>Dunaliella salina</i> dans la lagune Hutt en Australie (BASF/Cognis)	51
Figure I-26 : Traitement des eaux usées par les micro-algues	55
Figure I-27 : Productivité en huile des micro-algues par rapport à d'autres plantes oléagineuses	56
Figure II-1 : Photographie de <i>Chlorella vulgaris</i> (http://ccala.butbn.cas.cz)	70
Figure II-2 : Photographie de <i>Nannochloropsis oculata</i> (http://cfb.unh.edu)	71
Figure II-3 : Photographie de <i>Dunaliella salina</i> (http://ccala.butbn.cas.cz)	72
Figure II-6 : Représentation schématique du Soxhlet (1 : Sortie d'eau, 2 : Entrée d'eau, 3 : Réfrigérant, 4 : Soxhlet, 5 : Chambre du Soxhlet, 6 : Cartouche, 7 : Système de distillation, 8 : Siphon, 9 : Ballon, 10 : Solvant, 11 : Chauffé ballon)	73
Figure II-7 : Procédure d'élimination du solvant	73
Figure II-8 : Schéma du Dean Stark modifié	74

Figure II-9: Schéma descriptif du SDEP (vert: pâte algale, bleu: eau de la pâte algale et marron: solvant terpénique)	74
Figure II-10: Schéma du SDEP/MO	75
Figure II-11 : Les différents modules de l'HPTLC	79
Figure III-1 : Processus d'extraction solide-liquide dans une cellule.....	83
Figure III-2: Le solvant "idéal"	84
Figure III-3 : Schéma du Soxhlet (source : Tech. de l'Ing.) R : Réfrigérant, E : Extracteur, B : Ballon.....	87
Figure III-4 : Démarche expérimentale de l'article : « Terpenes as Green Solvents for Extraction of Oil from Microalgae »	89
Figure III-5: Profil d'acides gras des extraits lipidiques	90
Figure IV-1: Approche conventionnelle.....	108
Figure IV-2 : Démarche expérimentale de l'article: " New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process"	110
Figure IV-3: Modélisation du pouvoir de solubilité de différents solvants pour l'extraction des lipides de <i>Nannochloropsis oculata</i> et <i>Dunaliella salina</i> (logiciel : Hansen Solubility Parameters in Praticce)	111
Figure IV-4: Comparaison des rendement lipidiques pour <i>Nannochloropsis oculata</i>	112
Figure IV-5: Comparaison des rendements lipidiques pour <i>Dunaliella salina</i>	113
Figure IV-6: Distribution des classes de lipides des extraits lipidiques par HPTLC	114
Figure IV-7: Composition en acides gras des extraits de <i>Nannochloropsis oculata</i> selon les différentes méthodes d'extraction.....	115
Figure IV-8: Composition en acides gras des extraits de <i>Dunaliella salina</i> selon les différentes méthodes d'extraction.....	116
Figure IV-9 : Chromatogramme d'un extrait lipidique SDEP de <i>Dunaliella salina</i>	116
Figure V-1: Le spectre électromagnétique	133
Figure V-2 : Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage	134
Figure V-3 : Schéma de fours à micro-ondes monomode (gauche) et multimode (droite).....	137
Figure V-4 : Démarche expérimentale	138
Figure V-5: Cinétique de l'eau éliminée issue de la pâte algale obtenue par distillation azéotropique avec le p-cymène	139
Figure V-6: Etude de la puissance micro-ondes.....	139
Figure V-7 : Cinétiques de séchage de la biomasse algale.....	140
Figure V-8: Mécanisme de rupture des parois cellulaires sous l'effet micro-ondes, 1- Rotation dipolaire de l'eau, 2- Augmentation de la température et de la pression, 3- "Explosion" des cellules et libération du contenu cellulaire.....	141
Figure V-9: Répartitions des classes de lipides des extraits pour les différentes puissances	141
Figure V-10: Profils d'acides gras des extraits lipidiques pour les différentes puissances testées	142
Figure V-11: Répartition des classes de lipides des extraits lipidiques des différentes espèces.....	143
Figure V-12 : Profils d'acides gras des extraits lipidiques de <i>Nannochloropsis oculata</i>	144

Table des tableaux

Table des tableaux

Tableau I-1 : Compositions biochimiques de micro-algues (Becker, 2007)	24
Tableau I-2 : Une sélection d'espèces de micro-algues avec leurs produits et domaines d'application (Pulz and Gross, 2004).....	47
Tableau II-1: Solvants et réactifs utilisés pour les expérimentations	69
Tableau III-1: Les propriétés physico-chimiques du n-hexane et des solvants terpéniques.....	85
Tableau V-1 : Valeurs de constante diélectrique (ϵ') et du facteur de perte diélectrique (ϵ'') obtenues à 20°C .	135
Tableau V-2 : Rendements lipidiques des différentes méthodes d'extraction à partir des deux espèces de micro-algues traitées.....	143

Liste des abréviations

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
AGL : Acides Gras Libres
AGPI : Acides Gras PolyInsaturés
AOAC : Association of Analytical Chemists
BHT : Hydroxytoluène butylé
Bp : Boiling point
CCM : Chromatographie sur Couche Mince
CEA : Commissariat à l'Energie Atomique
CG-FID : Chromatographie Gaz avec Détecteur à Ionisation de Flamme
CG-MS : Chromatographie Gaz avec Spectromètre de Masse
CMR : Cancérigène Mutagène et toxique pour la Reproduction
CO₂ : Dioxyde de carbone
COV : Composés Organiques Volatils
CPG: Chromatographie Phase Gazeuse
CuSO₄ : Sulfate de Cuivre
DAG : Diacylglycérol
DEC : Densité d'Energie de Cohésion
DHA : acide Docosahexaénoïque
EHF : Extrêmement Haute Fréquence
EMAG : Esters Méthylique d'Acides Gras
EPA : Acide Eicosapentaénoïque
EPS : Exopolysaccharides
FAME : Fatty Acids Methyl Ester
FUI : Fond Unique Interministériel
GC : Gas Chromatography
GES: Gaz à Effet de Serre
GL : Glycolipides
GLA : Acide γ -linoléinique
GREEN : Groupe de Recherches en Eco-Extraction de produits Naturels
H₂SO₄ : Acide Sulfurique
H₃PO₄ : Acide o-phosphorique
HCMV : Cytomégalovirus humain
HHV-6 : Herpès Virus Humain de type 6
HPLC : High Performance Liquide Chromatography

Liste des abréviations

HPTLC : High Performance Thin Layer Chromatography
HSP : Hansen Solubility Parameters
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
LCA : Life Cycle Assessment
LPC : Lyso-Phosphatidylcholine
MAG : Monoacylglycérol
MO : Matière Organique
SDEP/MO: Procédé d'Extraction et de Distillation Simultané assisté par micro-ondes
MS : Matière Sèche
MT : Matière Totale
MUFA : Mono-Unsaturated Fatty Acids
MW/SDEP : Simultaneous Distillation and Extraction Process assisted by microwaves
NaCl : Chlorure de Sodium
NRC : National Research Council
NREL : National Renewable Energy Laboratory
PBR : Photobioréacteur
PC : Phosphatidylcholine
Pc : Pression critique
PE : Phosphatidyléthanolamine
PL : Phospholipides
PME : Petites et Moyennes Entreprises
PUFA : Poly-Unsaturated Fatty Acids
SDEP : Simultaneous Distillation and Extraction Process
SFA : Saturated Fatty Acids
SHF : Supra Haute Fréquence
SiO₂ : Dioxyde de Silicium (Silice)
SOD : SuperOxyde Dismutase
TAG : Triacylglycérol
Tc : Température critique
UHF : Ultra Haute Fréquence
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
 ΔH_{vap} : Enthalpie de vaporisation (kJ/mol)

Céline DEJOYE TANZI

Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant

Résumé :

La biodiversité des micro-algues constitue un réel potentiel pour la recherche et l'industrie. En comparaison des plantes terrestres, elles sont une piste prometteuse pour les biocarburants. Néanmoins, un certain nombre de verrous technologiques restent à lever comme l'extraction de l'huile algale. L'objectif de cette thèse a donc consisté en l'innovation et le développement de nouvelles méthodologies dits « vertes » d'extraction de lipides de micro-algues pour une application biocarburant.

La première partie de ce manuscrit propose une alternative à l'utilisation de solvants pétrochimiques (n-hexane) pour l'extraction des lipides à partir d'une biomasse sèche grâce aux solvants terpéniques d'origine végétale.

Ces résultats encourageants ont permis dans une seconde partie de s'orienter vers le développement d'une technique permettant l'extraction des lipides de micro-algues humides (80% d'humidité) par des solvants terpéniques : le SDEP (Simultaneous Distillation and Extraction Process).

Afin d'accélérer le processus d'extraction, dans la troisième et dernière partie de ce travail les micro-ondes ont permis d'intensifier ce procédé. Les micro-ondes permettent un échauffement rapide de l'eau environnante et contenue dans les cellules impliquant ainsi une libération rapide du contenu cellulaire vers le milieu extérieur. Ce travail a consisté en l'intensification et l'optimisation de cette technique d'extraction (SDEP) destinée à l'extraction des lipides à partir de micro-algues humides : le SDEP assisté par micro-ondes. L'appareillage permet des extractions rapides, non destructrices et généralisables à différentes espèces de micro-algues discutées dans cette troisième partie.

Mots-clés : extraction, solvants terpéniques, lipides, micro-algues, micro-ondes

Eco-Extraction and analysis of lipid from microalgae for the production of biodiesel

Summary:

The biodiversity of microalgae is a real potential for research and industry. Compared to terrestrial plants, they are a promising route for biofuels. Still, a number of technological locks is to lift as the the algal oil extraction. The objective of this thesis has consisted of innovation and development of new methodologies, so-called "green" extraction of lipid of microalgae for biofuel application.

The first part of this manuscript proposes an alternative to the use of petrochemical solvents (n-hexane) extraction of lipids on a dry biomass with terpene solvents from plant origin.

These encouraging results have allowed in a second part of move towards the development of a technique for the extraction of lipids of wet microalgae (80% of humidity) by terpene solvents; the SDEP (Simultaneous Distillation and Extraction Process).

To accelerate the process of extraction, in the third and final part of this work the microwaves have allowed to intensify this process. Microwave allow a fast heating of water surrounding and contained in cells thus implying a rapid release of the cell contents into the environment. Our work consisted in the intensification and optimization of the extraction technique (SDEP) intended for the extraction of lipids from wet microalgae: SDEP assisted by microwaves. The apparatus allows rapid and non-destructive extractions that can be generalizable for different species of microalgae discussed in this third part.

Keywords : extraction, terpene solvents, lipids, microalgae, microwaves

Laboratoire GREEN (Groupe de Recherche en Eco-Extraction de produits Naturels)

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UFR Sciences, UMR 408, 33 rue Louis

Pasteur, 84000 Avignon

