

# Hydrolyse et quantification des monosaccharides de *Chlorella vulgaris*

Avec le soutien du Fonds Européen de Développement Régional

Aldo MIRISOLA<sup>1</sup>, Guillaume DELFAU--BONNET<sup>1,2</sup>, Adrien HOUZE<sup>1</sup>, Damien VERDONCK<sup>1</sup>, Tiphaine CLEMENT<sup>2</sup>, Florent ALLAIS<sup>2</sup>, Anne-Lise HANTSON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Département des Génie des Procédés Chimiques et Biochimiques, Université de Mons, Belgique

<sup>2</sup>Unité de Recherche et Développement Agro-Biotechnologie Industrielles, AgroParisTech, France

## Introduction

Les microalgues sont des microorganismes photosynthétiques présents dans les eaux douces et salées. Leur diversité permet de les valoriser dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, bioénergétique, de la bioremédiation et de la synthèse de polymères [1], [2]. Toutefois, la rupture de la paroi cellulaire de certaines microalgues se trouve être le principal verrou technologique pour l'extraction des composés intracellulaires (lipides, protéines et polysaccharides) (fig 1) [3]. Plusieurs procédés de disruption cellulaire sont repris dans la littérature : thermiques (micro-ondes, autoclavage, congélation/décongélation), mécaniques (broyeur à billes, ultrasons, haute pression, séchage par pulvérisation), biochimiques (dégradation microbienne ou par voie enzymatique) et chimique (hydrolyse acide ou alcaline, extraction au CO<sub>2</sub> supercritique). Cette étude a pour objectif d'optimiser la dégradation de *C. vulgaris* (Allmicroalgae®) par prétraitement chimique et de comparer les résultats obtenus avec des hydrolyses enzymatiques. Notons que des conditions opératoires trop sévères (température, concentration en acide) peuvent mener à la formation de produits indésirables tels que le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) et l'acide lévulinique (fig 2)[4]. Des conditions d'hydrolyses chimiques plus douces permettront de contrôler l'apparition de tels composés.

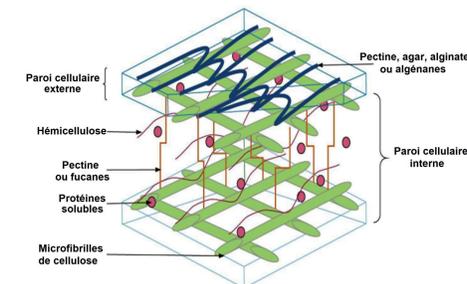


Figure 1 : Schéma de la structure de la paroi de microalgues [5]

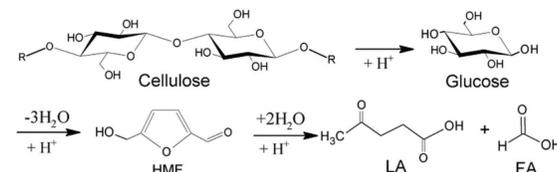


Figure 2 : Réaction de formation de d'acide formique (FA), 5 hydroxy-méthyl-furfural (HMF) et d'acide lévulinique (LA) à partir de cellulose [5]

## Hydrolyse chimique

Plan d'expériences factoriel complet (tronqué) :

- Deux variables continues à trois niveaux :
  - Concentration acide : 0,1 ; 1,55 et 3 N
  - Température : 50 ; 85 et 120 °C
- Une variable catégorielle à deux niveaux :
  - Type d'acide : chlorhydrique ou sulfurique

## Hydrolyse enzymatique

Trois cocktails enzymatiques :

- Pancréatine porcine : Panreac Applichem®, Amylase: 22500 FIP U/g, lipase: 22500 FIP U/g, protéase: 1050 FIP U/g
- β-glucanase de *Trichoderma longibrachiatum* : Sigma Life Science®, 3,6 U/mg à pH 5 ;
- Cellulase d'*Aspergillus Niger* : Affymetrix/USB®

## Matériel et Méthodes

### Hydrolyse de la biomasse lyophilisée

#### Chimique :

HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Durée : 6 heures  
Température : 50, 85 ou 120 °C  
Concentration : 0,1 ; 1,55 ou 3 N

#### Enzymatique :

- Durée : 24 heures
- Température 40 °C
- Milieu tamponné : Mclivaine (β-glucanase et la cellulase à pH 5 et pancréatine à pH 7)
- Enzyme/biomasse : 1 % ou 5 % (mg/mg)

### Préparation de l'échantillon pour l'analyse

Neutralisation au NaOH  
Centrifugation 15 min à 2000 g  
Filtration du surnageant sur membrane en PVDF 0,45 µm

### Analyse des sucres réducteurs par la méthode DNS

Réaction des sucres réducteurs avec l'acide 3,5-dinitrosalicylique en milieu basique  
Réaction à 95 °C pendant 5 min  
Lecture de la densité optique à 530 nm

## Résultats et discussion

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	0,1374507	0,004267	32,21	<.0001*
Temp(50,120)	0,0544797	0,004267	12,77	<.0001*
Normalité(0,1;3)	0,0459011	0,004267	10,76	<.0001*
Temp*Temp	-0,049156	0,006034	-8,15	<.0001*
Normalité*Normalité	-0,047759	0,006034	-7,91	<.0001*
Temp*Temp*Normalité	-0,041402	0,005481	-7,55	<.0001*
Temp*Temp*Normalité*Normalité	0,0403926	0,008152	4,96	0,0008*
Temp*Normalité	-0,014027	0,00344	-4,08	0,0028*
Temp*Acide[HCl]	-0,005889	0,002699	-2,18	0,0570
Temp*Normalité*Normalité	-0,007	0,005481	-1,28	0,2335

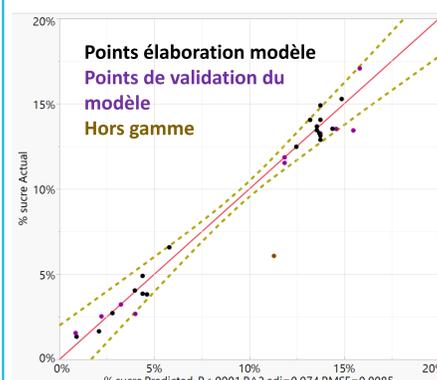


Figure 3 : Paramètres estimés et adéquation du modèle simulé par le logiciel JMP® par rapport aux valeurs mesurées

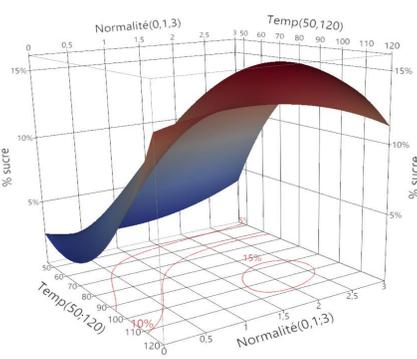


Figure 4 : Surface de réponse obtenue avec une hydrolyse avec de l'acide chlorhydrique simulé par le logiciel JMP®

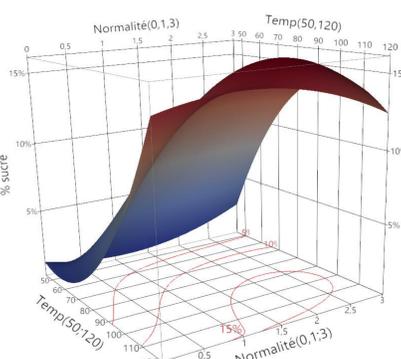


Figure 5 : Surface de réponse obtenue avec une hydrolyse avec de l'acide sulfurique simulé par le logiciel JMP®

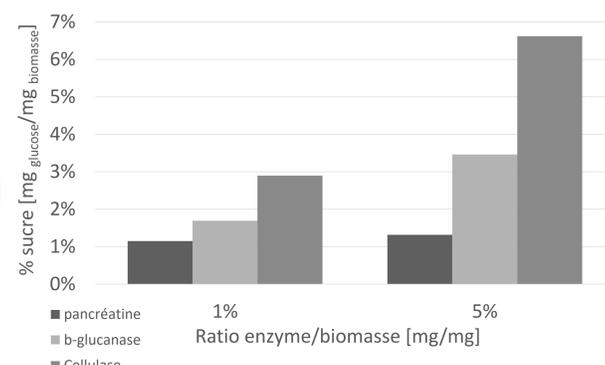


Figure 6 : Pourcentage de glucose équivalent libéré après l'hydrolyse enzymatique pendant 24 heures à 40 °C de *C. vulgaris* lyophilisée (Allmicroalgae®)

- Faible concentration en acide → rendement important si la température est supérieure à 120 °C
- Effet négatif d'une combinaison haute température et concentration importante → potentielle formation de 5-HMF et d'acide lévulinique (fig 3, 4 et 5)
- Hydrolyse optimale pour les deux acides : 95 °C ; 2,3N
- Cellulase choix prometteur mais sans atteindre les taux d'hydrolyse optimaux obtenus par voie chimique : 7% (Fig 6) vs. 15%

## Conclusions et perspectives

- Les conditions optimales d'hydrolyse chimique fournissent des teneurs en sucres analogues aux données du fournisseur soit environ 16%
- Vérification nécessaire de l'apparition de 5-HMF et/ou de l'acide lévulinique à haute température et forte concentration d'acide
- Optimisation des hydrolyses enzymatiques (ratio enzyme/biomasse, cocktails de différentes enzymes, pH,...)
- Caractérisation des différents monosaccharides obtenus après hydrolyse (HPLC-ELSD)

## Références

- [1] Kim, K.H., Choi, I.S., Wi, S.G, Bae, H.J. (2014) Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation, *Bioresour. Technol.* 153:47-54.
- [2] Kim, K.H., Choi, I.S., Wi, S.G, Bae, H.J. (2014) Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation, *Bioresour. Technol.* 153:47-54.
- [3] The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products, / Khan, Muhammad Imran; Shin, Jin Hyuk; Kim, Jong Deog, *Microbial Cell Factories*, 2018
- [4] Jönsson LJ, Martín C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour. Technol.* 199:103–112. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415014042>.
- [5] Velazquez-Lucio J, Rodríguez-Jasso RM, Colla LM, Sáenz-Galindo A, Cervantes-Cisneros DE, Aguilar CN, Fernandes BD, Ruiz HA. 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Res. J.* 5:780–791. [6] Achinas S, Euverink GJW. 2016. Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass. *Electron. J. Biotechnol.* 23:44–53. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S071734581630077X>.

QR code