

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : « *Génie des Procédés et Bioprocédés* »

Par

Téné Rosine ZINKONE

**« Broyage à billes de microalgues : étude et modélisation par classes
de taille, application au bioraffinage »**

Thèse présentée et soutenue à « Saint-Nazaire », le « 06/11/2018 »

Unité de recherche : Laboratoire GEPEA, UMR-CNRS 6144

Rapporteurs avant soutenance :

Christine FRANCES

Céline LAROCHE

Directrice de Recherche CNRS, INP Toulouse

Maître de conférences HDR, Université Clermont Auvergne

Composition du Jury :

Président : Florent ALLAIS

Examineurs : Filipa LOPES

Dir. de thèse : Luc MARCHAL

Co-dir. de thèse : Jérémy PRUVOST

Directeur Chaire ABI-Agroparistech

Maître de conférences, Centrale Supélec, Paris

Maître de conférences HDR, Université de Nantes

Professeur Université de Nantes

A toi papa qui a été le premier à me voir docteur,

Remerciements

A l'issue de ces trois années de travail je voudrais remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à cet accomplissement.

Je remercie les directeurs du laboratoire, Jack LEGRAND, Pascal JAOUEN et Jérémy PRUVOST qui m'ont permis de faire mes travaux au sein du GEPEA.

J'adresse ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Luc MARCHAL qui m'a donné cette opportunité et qui a suivi l'évolution de mes travaux avec son enthousiasme et ses précieux conseils qui m'ont poussée à aller au-delà des difficultés. Je remercie également mon co-directeur de thèse Jérémy PRUVOST qui malgré ses nombreuses responsabilités a participé aux discussions, a facilité l'acquisition de moyens matériels pour les travaux et a consacré de son temps pour la correction de rapports et présentations.

Je remercie tous les membres de mon comité de suivi de thèse qui ont permis d'orienter mes travaux de recherche notamment Jack LEGRAND et Jérôme MORCHAIN.

J'associe à ces remerciements les membres du Jury de ma soutenance : Christine FRANCES Directrice de Recherche au CNRS à l'INP Toulouse, Céline LAROCHE Maître de conférences HDR de l'Université Clermont Auvergne, Florent ALLAIS Directeur de la Chaire ABI-AgroParisTech et Filipa LOPES Maître de conférences à CentraleSupélec, qui ont accepté de juger mon travail et ont contribué à l'améliorer.

A Imma, Marie, Laura, Hélène, Guillaume R, Emmanuel, Raphaëlle, Jordan, Benjamin, Thomas R, Valéria M, Laurence, Catherine et Delphine j'exprime ma gratitude pour leur aide précieuse, leur bienveillance et leur support technique pendant mes expériences.

Merci à vous qui avez fait de mon passage au GEPEA un plaisir : Sébastien C, Franck, Laurette, mes collègues doctorants Rémi X, Rémy C, Guillaume T, Alexandra, Philippe, Antoine, Sym, Sikandar, Kashif, Jérémy, Briec. Mes chers ananas et amis du labo Erika, Antoinette, Myriam, Shuli, Charlène, Lisa, Marlène, Dounia, Liliana, Adeline, Fernando, Vladimir, Armel, Shawn, Camilo, Momo, Sita, ce fut une immense joie de vivre tous ces moments avec vous. Vous avez rendu ma thèse agréable et inoubliable par votre amitié. Mes chers amis Célia, Mathilde, Khaoula, Mélissa, Nancy, Jefferson, Fellipe, Eliane, Alexandra, Ida, Alice, Arlette, Natacha, Mariama, Salim, Abdoulaye, Alexandre, Fabrice, Cheikh, Herman, merci pour votre soutien.

Je remercie ma famille : ma mère Clarisse, Béa, Sylvie, Aline, Martine, Jean-Denis, Margo, Roger, Marcel et toi mon lolou Kabayi pour la force et le courage que vous m'avez données et qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Liste des communications

Publications internationales :

Zinkoné, T.R., Gifuni, I., Lavenant, L., Pruvost, J., Marchal, L., 2018. Bead milling disruption kinetics of microalgae: Process modeling, optimization and application to biomolecules recovery from *Chlorella sorokiniana*. Bioresource Technology. 267, 458–465. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.080>

Article à soumettre :

Zinkoné, T.R., Menestreau, M, Pruvost, J., Marchal, L., 2019.
"Effect of cell life stage on their resistance to bead milling disruption"

Communication orale à un congrès international

Rosine ZINKONE, Luc MARCHAL, Jérémy PRUVOST « Study of microalgae lysis by bead milling: a population balance approach » 10th World Congress of Chemical Engineering. Barcelona (Spain) from 1st to 5th October 2017.

Communication orale à un congrès national

Rosine ZINKONE, Luc MARCHAL, Jérémy PRUVOST « Study of microalgae lysis by bead milling: a population balance approach » 16^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés. Nancy du 11 au 13 Juillet 2017.

Communication Poster à un congrès international

Rosine ZINKONE, Luc MARCHAL, Jérémy PRUVOST « Study of microalgae lysis by bead milling: a population balance approach » 6th Congress of International Society for Applied Phycology. Nantes du 18 au 23 Juin 2017.

Téné Rosine ZINKONE, Imma GIFUNI, Laurence LAVENANT, Guillaume ROELENS, Marie CUEFF, Jérémy PRUVOST, Luc MARCHAL « Kinetics modeling and optimization of microalgae cells disruption by bead milling » ALGAEUROPE 2018, Amsterdam du 4 au 6 Décembre 2018

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART SUR LE BIORAFFINAGE DES MICROALGUES ET LA MODELISATION DU BROYAGE A BILLES	5
INTRODUCTION.....	6
1. Bioraffinage des microalgues.....	7
1.1 Systèmes de production et de récolte des microalgues (USP).....	7
1.1.1 Production et récolte des microalgues.....	8
1.1.1.1 Sélection des souches.....	8
1.1.1.2 Souches d'étude et applications.....	8
1.1.1.3 Méthodes de production des microalgues	12
1.1.1.4 Nouvelles tendances de production.....	16
1.1.1.5 Méthodes de récolte des microalgues.....	16
1.2 Le downstream processing (DSP).....	19
1.2.1 La conversion de la biomasse en bioénergies	19
1.2.1.1 Les méthodes thermochimiques	20
1.2.1.2 Les méthodes biochimiques.....	21
1.2.1.3 La transestérification	21
1.2.1.4 Les photobiopiles.....	22
1.2.2 Récupération et valorisation des différentes fractions de la biomasse :.....	22
1.2.2.1 Lipides	24
1.2.2.2 Les protéines	25
1.2.2.3 Les glucides	25
1.2.2.4 Les pigments.....	26
1.2.2.5 Les vitamines.....	27
1.3 Conclusions sur le bioraffinage des microalgues	27
2. Les méthodes de destruction cellulaire.....	28
2.1 Généralités sur la destruction cellulaire	28
2.1.1 Importance de la destruction cellulaire.....	28
2.1.2 Mesure de la destruction cellulaire	30
2.1.3 Critères de choix des méthodes de destruction pour le bioraffinage.....	32
2.2 Méthodes chimiques et enzymatiques.....	32
2.2.1 Méthodes chimiques.....	32
2.2.2 Méthodes enzymatiques.....	33

2.3	Méthodes physiques.....	33
2.3.1	Méthodes basées sur les ondes	33
2.3.1.1	Les champs électriques pulsés (CEP).....	33
2.3.1.2	Les ultrasons (US)	35
2.3.1.3	Les microondes.....	35
2.3.2	Méthodes mécaniques.....	36
2.3.2.1	La cavitation hydrodynamique (CH) :.....	36
2.3.2.2	Broyage à haute vitesse (BHV).....	37
2.3.2.3	Broyage haute pression (BHP).....	37
2.3.2.4	Le broyage à billes (BB)	39
2.4	Bilan sur les méthodes de destruction cellulaire	43
3.	Modélisation de l'opération de broyage à billes.....	44
3.1	Approches de modélisation.....	44
3.1.1	Modèles empiriques.....	44
3.1.2	Modèles semi-empiriques	46
3.1.3	Modèles basés sur les simulations numériques	46
3.2	Développement du modèle de stress	48
3.2.1	Mouvement des billes et mécanismes de broyage	48
3.2.1.1	Mouvement des billes	48
3.2.1.2	Mécanismes de broyage.....	50
3.2.2	Dérivation des expressions de SE et SN.....	50
3.2.3	Modèle de stress amélioré et transposition des résultats de broyage.....	56
	Conclusion	59

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES POUR LA PRODUCTION ET LE BROYAGE A BILLES DE MICROALGUES

1.	Production de microalgues et suivi de culture :	63
1.1	Culture de <i>Parachlorella kessleri</i>	63
1.1.1	Préculture :	63
1.1.2	Culture en Photobioréacteur.....	64
1.2	Culture synchronisée de <i>Neochloris oleoabundans</i>	64
1.2.1	Principe de la synchronisation des cultures de microalgues.....	64
1.2.2	Méthode de synchronisation de <i>N. oleoabundans</i>	65
1.3	Culture de <i>Chlorella sorokiniana</i>	67
1.4	Culture de <i>Chlorella vulgaris</i>	68
1.5	Suivi des cultures.....	68

1.5.1	Mesure de la matière sèche.....	68
1.5.2	Mesure de la fragilité cellulaire par broyage haute pression.....	69
1.5.2.1	Description de l'équipement et principe de fonctionnement.....	69
1.5.2.2	Mise en œuvre du broyage haute pression (BHP)	70
2.	Broyage à billes	70
2.1	Description des équipements	70
2.1.1	Broyeur de l'échelle laboratoire	70
2.1.2	Caractéristiques des billes utilisées.....	71
2.2	Mise en œuvre du broyage à billes	71
3.	Analyse et caractérisation de la destruction cellulaire	72
3.1	Méthode de comptage et d'analyse de taille.....	72
3.1.1	Préparation des échantillons :	72
3.1.2	Analyse d'images	73
3.1.2.1	Analyse standard	73
3.1.2.2	Cas particuliers d'analyse d'image	77
3.1.2.3	Validation de la méthode de comptage et d'analyse de taille.....	79
3.2	Analyses biochimiques du broyat.....	80
3.2.1	Analyse des protéines solubles	80
3.2.2	Analyse des pigments.....	81
4.	Etude de la distribution des temps de séjour	82
4.1	Généralités sur la distribution des temps de séjour	82
4.2	Protocole expérimental.....	83
4.3	Analyse des résultats.....	84
5.	Approche pour l'estimation des incertitudes.....	85

CHAPITRE 3 : EFFET DE LA DISPARITE DES CELLULES DANS LES CULTURES DE MICRO ALGUES SUR LA RESISTANCE AU BROYAGE MECANIQUE..... 87

Introduction.....	88
1. Effect of cell life stage on their resistance to bead milling disruption	89
1.1 Introduction.....	89
1.2 Theoretical background.....	90
1.3 Materials and methods.....	91
1.3.1 Synchronous culture of <i>N. oleoabundans</i>	91
1.3.2 Dry weight measurement	91
1.3.3 Bead milling disruption	92
1.3.4 Cell counting and size distribution analysis.....	92

1.3.5	Cell fragility evaluation.....	93
1.3.6	Protein and chlorophyll a release.....	93
1.4	Results and discussion.....	94
1.4.1	Synchronization of <i>Neochloris oleoabundans</i>	94
1.4.2	Effect of cell cycle stage on cell disruption in bead mill.....	96
1.4.3	Comparison between cell disruption and metabolite release	98
1.5	Conclusion	99
2.	Effet de la taille des cellules sur la fragilité cellulaire au broyage haute pression	100
2.1	Broyage haute pression de <i>P. kessleri</i> et <i>C. sorokiniana</i>	100
2.1	Comparaison <i>C. sorokiniana</i> et <i>P. kessleri</i>	102
2.2	Effet de fatigue sur la fragilité au broyage haute pression.....	103
	Conclusion	105
CHAPITRE 4 : MODELISATION DU BROYAGE A BILLES DE MICROALGUES.....		106
	Conclusion	106
	Introduction	107
1.	Etude de la DTS dans le broyeur et de la cinétique de broyage	108
1.1	Effet des paramètres opératoires sur la DTS	108
1.2	Validation de l'ordre de la cinétique de broyage.....	113
1.3	Choix du modèle de DTS pour la modélisation de la cinétique de broyage.....	114
1.4	Importance de la DTS pour l'évaluation de la cinétique de destruction.....	116
1.4.1	Analyse des ordres de grandeurs des temps caractéristiques	116
1.4.2	Cinétique apparente et cinétique vraie.....	117
2.	Bilans matières et équations cinétiques de broyage	118
3.	Etude paramétrique de la cinétique de broyage à billes	120
3.1	Effet du débit sur la cinétique de broyage.....	120
3.2	Effet du diamètre des billes.....	121
3.3	Effet de la vitesse d'agitation	123
3.4	Effet de la concentration des cultures.....	125
4.	Modèle de Stress	126
4.1	Adaptation du modèle de stress au cas des microalgues.....	126
4.2	Validation expérimentale des hypothèses	128
4.3	Application du modèle sur <i>C. vulgaris</i> et <i>P. kessleri</i>	129

4.3.1	Energie de stress optimale	129
4.3.2	Prédiction des constantes cinétiques	132
4.3.3	Comparaison des fragilités de <i>C. vulgaris</i> et de <i>P. kessleri</i>	133
4.4	Conditions de libération sélective des protéines et de la chlorophylle a	134
Conclusion		136
CHAPITRE 5: BEAD MILLING DISRUPTION KINETICS OF MICROALGAE: PROCESS MODELING, OPTIMIZATION AND APPLICATION TO BIOMOLECULES RECOVERY FROM <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>		138
INTRODUCTION.....		139
1.	Materials and methods	141
1.1	Microalgal strain and culture.....	141
1.2	Disruption modeling.....	142
1.2.1	Hydrodynamics and kinetics considerations	142
1.2.2	Stress model.....	143
1.3	Centrifugation	145
1.4	Analysis of the recovered products.....	146
2.	Results and discussion.....	147
2.1	Biomass composition	147
2.2	Evolution of the size distribution during bead milling	147
2.3	Effect of bead size and agitation speed on the overall disruption kinetics	148
2.4	Effect of cell size on the disruption kinetics	148
2.5	Stress model applied to each size class	149
2.5.1	Model validation.....	149
2.5.2	Prediction of the disruption kinetics	151
2.5.3	Prediction of metabolites recovery as function of the energy consumption	152
CONCLUSION		154
CHAPITRE 6 : INDUSTRIALISATION DU BROYAGE A BILLES DE MICROALGUES....		155
Introduction.....		156
1.	Changement d'échelle	157
1.1	Méthode d'extrapolation	157
1.2	Etude de la DTS.....	158

1.3	Validation du modèle cinétique.....	160
2.	Optimisation de la consommation énergétique et de la productivité.....	161
2.1	Effet de la concentration sur l'efficacité du broyage.....	161
2.2	Consommation spécifique d'énergie.....	163
2.3	Capacité de production	165
3.	Choix du mode opératoire	165
	Conclusion	167
	CONCLUSION GENERALE	169
1.	Conclusions de l'étude	169
2.	Perspectives :	172
	187

Liste des figures

Figure 1 : Applications potentielles des microalgues modifié de (Enamala <i>et al.</i> , 2018)	1
Figure 2 :Schéma de la structure d'une cellule de <i>C. vulgaris</i> d'après (Safi <i>et al.</i> , 2014).....	9
Figure 3: Photos des microalgues colorées au Lugol prises au grossissement $\times 400$ sur des cellules de Malassez : FJ : cellules mères de <i>N. oleoabundans</i> obtenues par synchronisation de la division ; FN : cellules filles.....	11
Figure 4: Exemples de systèmes de production des microalgues: a systèmes de lagunes en Indonésie (sunchlorella.com); b système ouvert (www.universe-biofuel.com); c raceways ouverts (LBE Montpellier, France); d PBRs cylindriques inclinés (http://micro-algues-tpe.eklablog.com/); e PBRs tubulaires (ennesys.com); f Systèmes tubulaires (www.minapro.com); g PBRs airlift Subitec (photo prise sur la plateforme Algosolis, France); h PBRs plan incliné (algosolis.com); i PBR de façade (algosolis.com, projet SYMBIO ₂).....	13
Figure 5: Différents régimes d'atténuation de la lumière dans les PBRs en fonction de l'irradiance $G(z)$ et productivités volumétriques de biomasse correspondantes ($\langle r_x \rangle$): (a) régime de photo limité ; (b) régime d'absorption totale ; (c) régime cinétique (Pruvost and Cornet, 2012).....	15
Figure 6 : Principales voies de transformation de la biomasse des microalgues en source d'énergie (Tan <i>et al.</i> , 2015).....	21
Figure 7: Schéma de principe d'une cellule de photobiopile catalysée par des microalgues (Enamala <i>et al.</i> , 2018)	22
Figure 8 : Niveaux de destruction cellulaire (Montalescot, 2015)	30
Figure 9 : Exemple de procédé intégré de concentration, destruction cellulaire et d'extraction de lipides (OriginOil, 2010).....	34
Figure 10 : Schéma de systèmes de destruction cellulaire par ultrasons : (A) Ultrasons focalisés de haute intensité;(B) ultrasons de basse fréquence non focalisés (Wang <i>et al.</i> , 2014).....	35
Figure 11 : Schéma d'un système continu de destruction cellulaire par microondes (Balasubramanian <i>et al.</i> , 2011).....	36
Figure 12 :Exemples de dispositifs induisant la cavitation hydrodynamique (Yusaf and Al-Juboori, 2014).....	37
Figure 13 : Exemple d'agencement d'un broyeur à haute vitesse (Kumar and Pandit, 1999)	37
Figure 14 : Principe de fonctionnement du broyage haute pression (Jubeau, 2012).....	38
Figure 15 : Développement des broyeurs agités ; a : broyeurs à boulets ; b : attriteurs (1928) ; c broyeurs à sables « Sand Mills » (1950) ; d broyeurs à disques d'agitation (Kwade and Schwedes, 2007).....	40

Figure 16 : Différentes géométries de broyeurs à billes (a) broyeurs à disques d'agitation ; (b) broyeurs à doigts-contre doigts ; broyeur à gap annulaire (Kwade and Schwedes, 2007)	40
Figure 17 : Différents mécanismes de destruction cellulaire proposés par (Pan <i>et al.</i> , 2017)	45
Figure 18 : Différents contacts idéaux possibles entre billes et les directions correspondantes des vitesses (Beinert <i>et al.</i> , 2015).....	47
Figure 19 : Schéma du principe de modélisation multi échelles utilisée par Beinert <i>et al.</i> (2017)	48
Figure 20 : Vitesses axiales et radiales pour Re=2000 broyeur avec disques d'agitation (Blecher and Schwedes, 1996).....	49
Figure 21 : Trajectoires de billes de différentes tailles pour Re=2000 (Blecher and Schwedes, 1996).....	49
Figure 22 : Taille moyenne des particules x_{13} en fonction de l'énergie spécifique E_v pour différentes géométries de broyeurs et paramètres opératoires (Schwedes and Bunge, 1992)	50
Figure 23 : Corrélation entre taux de destruction cellulaire de <i>Arthrobacter sp</i> avec la fréquence de stress à différentes vitesses d'agitation (Bunge <i>et al.</i> , 1992)	51
Figure 24 : Volume actif entre deux billes en collision (Kwade and Schwedes, 2002)	53
Figure 25 :Energie de stress requise pour obtenir une taille moyenne de produit de 2 μm pour le broyage de calcaire (Kwade, 2003).....	55
Figure 26 : Influence de la taille de la chambre de broyage sur la relation entre finesse du produit et l'énergie de stress SE (Stender <i>et al.</i> , 2004)	56
Figure 27 : Sources de dissipation d'énergie dans les broyeurs à billes (Kwade, 2004)	57
Figure 28 : Schéma du montage du réacteur airlift PMMA 6l.....	67
Figure 29 : Photos des systèmes de production : a culture de <i>C. sorokiniana</i> ; b culture de <i>N.oleoabundans</i> et <i>P. kessleri</i>	68
Figure 30 : Principe de fonctionnement du Broyeur Haute Pression (Yusaf and Al-Juboori, 2014)	70
Figure 31 : Schéma du broyeur à billes d'étude	71
Figure 32 : Description d'une cellule de Malassez.....	73
Figure 33 : Distribution de taille de la culture de <i>Chlorella sorokiniana</i> en régime permanent ...	75
Figure 34 : Distribution de forme de la culture de <i>Chlorella sorokiniana</i> en régime permanent ..	75
Figure 35 : Exemples de traitement d'images : a et c images d'un échantillon de culture <i>P. kessleri</i> avant et après traitement d'images ; b et d images d'un échantillon de broyat de <i>C. sorokiniana</i> avant et après traitement d'images	78
Figure 36 : Effet du nombre de cellules sur la distribution de taille de <i>C. sorokiniana</i>	79
Figure 37 : Schéma des Réacteurs idéaux RPA (a) et RP (b).....	83
Figure 38 : Exemples d'écarts par rapport aux écoulements idéaux.....	83
Figure 39 : Etalonnage du conductimètre : a courbe globale ; b détail sur la zone linéaire	84

Figure 40 :Pictures of dividing cells of <i>N. oleoabundans</i> after 4 h of dark phase: a cells can reach 1, 2 or 3 CP (commitment points) during the growth stage and consequently divide into 2 (red circle), 4 (blue circle) or 8 cells (purple circle) b : corresponding division steps into 2, 4 or 8 daughter cells.....	95
Figure 41 : Evolution of cell density (cell.ml ⁻¹) during the dark phases (DP) of the 1 st ,5 th and 6 th 16h/8h light/dark cycles for the synchronization of the culture of <i>N. oleoabundans</i> . Cells number is multiplied by 4 during the dark phase after the 5 th light/dark cycle indicating a synchronization of cells division.	95
Figure 42 : Evolution of the intact cells density (number of cells per ml of suspension) as a function of the cell size (D_{eqpc}) for different bead milling durations (mean residence time of 0; 1.3 min; 2.6 min and 3.9 min) with 0.37 mm glass beads at $Q=200$ mlmin ⁻¹ , $v=8$ m.s ⁻¹ and $\varphi=80$ %: a 16 h cells correspond to the cells at the end of the light period (mother cells) and b 24 h cells to the cells at the end of the dark period (daughter cells)	96
Figure 43 : Evolution of the disruption kinetic constants K_i of the cell size classes with the cell size (D_{eqpc}) during bead milling disruption of <i>N. oleoabundans</i> mother cells (24H cells) and daughter cells (16 H cells) with 0.37 mm glass beads at $Q=200$ ml.min ⁻¹ , $v=8$ ms ⁻¹ and $\varphi=80$ %. Error bars represents the uncertainty in the estimation of K_i induced by the standard deviation in cell counting of sample triplicates	97
Figure 44 : Evolution of cell disruption η (green curves), soluble protein release rate η_p (blue curves) and chlorophyll a release rate $\eta_{Chl a}$ (red curves) with bead milling disruption time (0.37 mm glass bead; $Q=200$ ml.min ⁻¹ , $v=8$ m.s ⁻¹ , $\varphi = 80$ %,) for the synchronized cells of <i>N. oleoabundans</i> cells: a 16 h cells corresponds to the mother cells (at the end of the light stage) and b 24 h cells to daughter cells (at the end of dark phase). Error bars represent the standard deviation between triplicates.	98
Figure 45 : Distributions de taille des cultures de <i>P. kessleri</i> et <i>C. sorokiniana</i>	100
Figure 46 : Taux de destruction des différentes classes de tailles (3,75 μ m, 4,25 μ m...7,25 μ m) au broyage haute pression en fonction de la pression de travail P (bars).	101
Figure 47 : Comparaison du comportement au BHP de <i>P. kessleri</i> et <i>C. sorokiniana</i> . a courbes de destructions globales des deux souches en fonction de la pression de travail. Les barres d'erreurs représentent les incertitudes estimées à partir de triplicat. b pression opératoire pour laquelle on atteint 50 % de destruction en fonction de la taille des cellules pour les deux souches. Les valeurs de P_{50} sont calculées par interpolation linéaire entre deux points expérimentaux	103
Figure 48 : Taux de destruction au Broyage Haute Pression en fonction de la taille des cellules de <i>C. sorokiniana</i> pour 3 passages successifs : P1, P2 et P3 à 500 bar. Les barres d'erreurs représentent l'incertitude estimée à partir du comptage de triplicat.....	104

Figure 49 : Schéma du modèle cascade RPA avec recirculation.....	109
Figure 50 : Exemple d'ajustement de la DTS expérimentale en bleu avec les modèles 2-RPA en vert et le modèle avec recirculation en orange (nombre de RPA fixé à 4) ($d_B = 0,375 \text{ mm}$; $v = 8 \text{ ms}^{-1}$ et $Q = 170 \text{ ml.min}^{-1}$). $E(t_r)$ désigne la fonction distribution de temps de séjour et t_r le temps réduit (rapport entre le temps expérimental et le temps de passage).....	110
Figure 51 : Nombre de Péclet en fonction de la vitesse de transport axial v et la vitesse d'agitation V_u (Schweddes and Bunge, 1992)	112
Figure 52 : Représentation de $-\ln (C/C_0)$ (C_0 et C les concentrations en cellules respectives avant broyage et après une durée de broyage donnée) en fonction du temps de broyage. Les tendances linéaires montrent un bon ajustement de la cinétique de destruction avec une cinétique d'ordre 1 autant pour les cinétiques globales que pour les cinétiques par classe de taille ($2,75\mu\text{m}$, $3,25\mu\text{m}$... $6,25\mu\text{m}$) avec deux conditions de broyage différentes des cultures de <i>C. vulgaris</i> et de <i>P. kessleri</i>	113
Figure 53 : Allure typique d'ajustement avec un 1 ^{er} ordre des cinétiques de destruction (ronds bleu), de libération des protéines (carrés oranges) et de la chlorophylle a (triangles verts) pour <i>P. kessleri</i> . Chaque point correspond à un passage au broyeur et donc à un temps de traitement correspondant au temps de séjour moyen à chaque passage. La tendance linéaire pour la destruction et la chlorophylle a montrent une cohérence avec un ordre 1. Pour les protéines il y a un plateau après le 3 ^{ème} passage pouvant être dû à une dégradation partielle des protéines pour des niveaux de broyage avancés.....	114
Figure 54 : Modèle de DTS dans le broyeur à billes.....	118
Figure 55 : Effet du débit sur le taux de destruction pour <i>C. vulgaris</i> pour un temps de séjour moyen de 5,3min (billes 0,375mm)	120
Figure 56 : Effet de la taille des billes sur la cinétique de destruction de <i>P. kessleri</i> . a constantes cinétiques globales en fonction de la taille des billes ; b (respectivement c) constantes cinétiques des classes de tailles en fonction de la taille des billes.....	122
Figure 57 : Effet de la taille des billes sur la cinétique de destruction de <i>C. vulgaris</i> a constantes cinétiques globales en fonction de la taille des billes ; b (respectivement c) constantes cinétiques des classes de tailles en fonction de la taille des billes.....	122
Figure 58 : Effet de la vitesse d'agitation et de la taille des cellules sur la cinétique de destruction de <i>P. kessleri</i>	124
Figure 59 : Effet de la vitesse d'agitation et de la taille des cellules sur la cinétique de destruction de <i>C. vulgaris</i>	124
Figure 60 : Effet de la concentration en biomasse sur a la constante cinétique de destruction et b les taux de destruction après 1 passage pour <i>C. vulgaris</i> avec des billes de 0,375 mm.....	126

Figure 61 : Comparaison des valeurs expérimentales de : a SN_{1i} (0,9) et b SN_{2i} (0,9) pour chaque classe de taille des cellules de <i>C. vulgaris</i> en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur SE (J)	129
Figure 62 : Nombre de stress requis pour avoir un taux de destruction de 90 % pour chaque classe taille SN_i (0,9) et pour la population globale $SN(0,9)$ des cellules de <i>P. kessleri</i> (a et c) et <i>C. vulgaris</i> (b et d) en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur SE (J)	130
Figure 63 : a et b Produit $SE.SN_i$ (0,9) par classe de taille des cellules de <i>P. kessleri</i> et <i>C. vulgaris</i> en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur SE (J) ; c Energie spécifique consommée pour broyer 60 % des cellules de levures (Kwade and Schwedes, 2002).....	131
Figure 64 : Prédicibilité de la constante cinétique de destruction en fonction de la fréquence de stress SF pour <i>P. kessleri</i> et <i>C. vulgaris</i> : a et b constantes cinétiques de destruction par classe de taille ; c et d constantes cinétiques de destructions globales.....	132
Figure 65 : Constantes cinétiques globales de destruction de <i>P. kessleri</i> et <i>C. vulgaris</i> en fonction de SE	133
Figure 66 : Constantes cinétiques de destruction de la classe de taille 4,25 μm de <i>P. kessleri</i> et de <i>C. vulgaris</i> en fonction de SF	134
Figure 67 : Sélectivités et taux de libération des protéines de <i>P. kessleri</i> en fonction de l'intensité de stress SI (J) : chaque valeur de SE représente une condition ; les sphères représentent les tailles de billes correspondantes (0,375 mm-1,3 mm)	135
Figure68 : <i>Chlorella sorokiniana</i> cells size distribution (number of cells at constant volume in each size class between 2 and 8 μm) during bead milling – P0: initial distribution – P1: 1 st pass (t=1.3min) – P2: 2 nd pass (t=2.6min) – etc. a) 0.375mm glass beads and b) 0.2mm zirconia beads at 10m.s ⁻¹	148
Figure 69 :Bead milling parameters effects on disruption kinetics – a) beads size effect on the overall kinetic constant K – b) Impeller tip velocity effect on the overall kinetic constant K – c) Disruption kinetic constants K_i according to the cell size for 8, 10 and 14 m.s ⁻¹ (0.375mm glass beads) – d) Disruption kinetic constants K_i according to the cell size for 0.375, 0.625, 0.900 and 1.30mm glass beads (14 m.s ⁻¹).	149
Figure 70 :Comparison of SN_1 (0.9) and SN_2 (0.9) for 90 % disruption rate prediction according to the stress intensity SI (J) and the microalgal cell size – a) $SN_1 i(0.9)$ and b) $SN_2 i(0.9)$ – c) SN_1 (0.9) applied to the whole population as a function of SI value	151
Figure 71 :Correlation between the disruption kinetic constants and the stress frequency SF_i (s ⁻¹) – a) K_i for each size classes – b) K for the overall population.....	152
Figure 72 :Supernatant and pellet distribution of different products according to the SI value– a)dry matter recovery– b) starch yield and purity in the pellet– c)protein yield and purity in the	

supernatant – d) chlorophyll yield and purity in the supernatant – dashed lines correspond to initial biomass composition.....	154
Figure 73 : 1 Photo du montage du broyeur pilote : a panneau de contrôle, b moteur d'entraînement de l'agitation, c chambre de broyage, d entrée eau de refroidissement, e sortie produit, f entrée suspension, g pompe d'alimentation , i et j cuves d'alimentation ; 2 Schéma coté du système d'agitation du broyeur NETZSCH LMZ 10 : k doigt d'agitation, l fente de récupération des billes	159
Figure 74 : DTS expérimentale $E(t_r)$ et modèle 2 RPA pour les deux conditions de broyage à 8 $m.s^{-1}$ et 14 $m.s^{-1}$	160
Figure 75 : Effet de la concentration en matière sèche sur la cinétique de destruction.....	161
Figure 76 : Effet de la matière sèche sur le nombre de stress requis par cellule pour obtenir 90 % de destruction $SNc(0,9)$ pour <i>N. oceanica</i> (billes verre 0,5 mm ; $Q=150 ml.mn^{-1}$) et <i>C. vulgaris</i>	163
Figure 77 : Consommation spécifique d'énergie en fonction du taux de destruction de <i>N. oceanica</i> pour une MS de 100 $g.l^{-1}$	164
Figure 78 : Comparaison des cinétiques de destruction selon le mode opératoire de broyage .	166

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition générale de différentes sources alimentaires humaines et des microalgues en % de matière sèche (Spolaore <i>et al.</i> , 2006)	7
Tableau 2: Comparatif des propriétés des parois cellulaires de <i>C. vulgaris</i> , <i>P. kessleri</i> et de <i>C. sorokiniana</i> (modifié de Yamamoto <i>et al.</i> , 2005)	10
Tableau 3: Harvesting methods overview: comparison based on strain limitation, final total suspended solids concentration (TSS), capital expenditures (CAPEX), operational expenditures (OPEX), energy demand and greenhouse gas emission (GHG) (Deconinck <i>et al.</i> , 2018)	20
Tableau 4: Récapitulatif de la valorisation des différentes fractions de la biomasse des microalgues (Trivedi <i>et al.</i> , 2015; Chew <i>et al.</i> , 2017; Khanra <i>et al.</i> , 2018; Maeda <i>et al.</i> , 2018)	23
Tableau 5: Exemples de microalgues à fortes teneurs en lipides (Chisti, 2007; Taleb <i>et al.</i> , 2015)	24
Tableau 6 : Composition générale des parois cellulaires de microalgues couramment utilisées en biotechnologies modifié de (Lee <i>et al.</i> , 2017)	29
Tableau 7 : Compilation d'études de broyage haute pression de microalgues : P : pression de travail ; n : nombre de cycles de broyage ; MS : matière sèche des suspensions ; η : taux de destruction ; t : durée du traitement ; P_{50} : pression pour 50 % de destruction ; E_s : Energie spécifique consommée.....	39
Tableau 8 : Synthèse d'études sur le broyage à billes de microalgues. d_B diamètre des billes ; MS matière sèche des suspensions ; Q débit d'alimentation du broyeur, t durée du traitement en batch ; φ taux de remplissage en bille de la chambre de broyage ; v vitesse d'agitation ; n nombre de passage dans le broyeur ; K , K_p et $K_{pigments}$ constantes cinétiques respectives de destruction et de libération des protéines et des pigments ; E_s énergie consommée par unité de masse de produit.....	41
Tableau 9 : Comparaison qualitative des méthodes de destruction modifié de (Günerken <i>et al.</i> , 2015).....	43
Tableau 10 : Effet qualitatif des principaux paramètres de broyage sur l'efficacité de destruction des microorganismes (Doucha and Lívanský, 2008; Montalescot <i>et al.</i> , 2015; Postma <i>et al.</i> , 2015)	45
Tableau 11 : Composition du milieu BBM modifié par (Van Vooren <i>et al.</i> , 2012)	63
Tableau 12 : Comparaison des conditions de culture de <i>N. oleoabundans</i> avec celles de De Winter <i>et al.</i> (2013, 2017).....	66
Tableau 13 : Caractéristiques des billes utilisées dans l'étude avec d_B le diamètre moyen des billes	71

Tableau 14 : Caractéristiques des distributions de taille et de forme des différentes souches étudiées (FJ : fin du régime lumière et FN : fin du régime obscurité).....	76
Table 15 : Evolution of the cells mean diameter (D_{eqpc}) during bead milling: 16 h cells correspond to the cells at the end of the light period (mother cells) and 24 h cells to the cells at the end of the dark period (daughter cells).....	96
Tableau 16 : Récapitulatif de l'étude de la DTS dans le broyeur avec d_B le diamètre des billes, v la vitesse en bout de pale, Q le débit d'alimentation, T_s le temps de séjour moyen, T_p le temps de passage, n le nombre de RPA en série et α le taux de recirculation.....	111
Tableau 17 : Impact du modèle de DTS sur la précision de l'estimation de la constante cinétique de destruction.....	115
Tableau 18 : Nombre de Damköhler pour les valeurs limites des conditions de broyage (conditions permettant d'obtenir les cinétiques les plus rapides, 2 min^{-1} , ou les plus lentes $0,1 \text{ min}^{-1}$).....	116
Tableau 19 : Ecart entre constantes cinétiques apparentes et constantes estimées avec le modèle 2-RPA pour <i>C. vulgaris</i> $\Delta K_{2 \text{ RPA}}$ et ΔK_{app} désignent les pourcentages d'incertitudes de $K_{2 \text{ RPA}}$ et K_{app}	117
Tableau 20 : Ecart entre constantes cinétiques apparentes et constantes estimées avec le modèle 2 RPA pour <i>C. vulgaris</i> . $\Delta K_{2 \text{ RPA}}$ et ΔK_{app} désignent les pourcentages d'incertitudes de $K_{2 \text{ RPA}}$ et K_{app}	118
Tableau 21 : Comparaison des constantes cinétiques obtenues aux échelles laboratoire et pilote pour le broyage de <i>N. oceanica</i> à 8 m.s^{-1} et 14 m.s^{-1} : $\varphi = 80 \%$, $d_B=0,5 \text{ mm}$; $\tau =1,8 \text{ min}$	160
Tableau 22 : Valeurs de la consommation spécifique d'énergie calculées en fonction du taux de destruction à 100 g.l^{-1} de <i>N. oceanica</i> pour les vitesses d'agitation 8 m.s^{-1} et 14 m.s^{-1}	164
Tableau 23 : Capacité de production du broyeur pilote avec une suspension de 100 g.l^{-1} de <i>N. oceanica</i>	165

Liste des symboles

Symbole	Définition	Unités
A	Aire de projection des particules	[m ²]
Abs_x	Absorbance à x nm	[-]
A_{rotor}	Aire du rotor	[m ²]
$Circ$	Circularité	[-]
C_0	Concentration cellulaire à l'entrée du broyeur	[Cellules.ml ⁻¹]
C_i	Concentration cellulaire à la sortie du $i^{\text{ème}}$ RPA	[Cellules.ml ⁻¹]
C_{norm}	Conductivité normalisée	[-]
c_v	Fraction volumique des particules dans la suspension	[-]
C	Nombre de cellules intactes par ml après broyage	[Cellules.ml ⁻¹]
$C_{p\ i}$	Concentration en protéines solubles dans le surnageant après i passages	[g.l ⁻¹]
$C_{p\ 2700b}$	Concentration en protéines solubles dans le surnageant après broyage à 2700 bar	[g.l ⁻¹]
$C_{Chl\ a,i}$	Concentration en chlorophylle a	[g.l ⁻¹]
D_a	Nombre de Damköhler	[-]
d_B	Diamètre moyen des billes	[m]
d_{μ}	Diamètre des microalgues	[m]
d_p	Taille moyenne des particules en alimentation	[m]
D_{eqpc}	Diamètre équivalent circulaire des cellules	[μm]
D_{ESD}	Equivalent Spherical Diameter	[μm]
E	Fonction distribution des temps de séjour	[-]
E_{exp}	Fonction de distribution des temps de séjour expérimentale	[-]
E_s	Energie spécifique consommée par le broyeur	[J.kg ⁻¹]
$E_{s,p}$	Energie spécifique reçue par les particules dans le broyeur	[J.kg ⁻¹]
E_m	Specific energy consumption for bead milling	[J.kg ⁻¹]
f_B	Facteur de proportionnalité entre énergie de stress maximale et énergie de stress moyenne dans le broyeur	[-]
G	Flux de photons	[μmoles _{hν} .m ⁻² .s ⁻¹]
g	Centrifugal acceleration	[m.s ⁻²]

H	Radial distance covered by particles during centrifugation	[m]
I_s	Indice de sélectivité de la libération des protéines par rapport à la chlorophylle a	[-]
k	Facteur d'élargissement de l'incertitude	[-]
K	Constante cinétique de destruction cellulaire	[min ⁻¹]
K_{app}	Constante cinétique de destruction cellulaire estimée sans tenir compte de la DTS	[min ⁻¹]
K_i	Constante cinétique de destruction des cellules de la classe de taille i	[min ⁻¹]
K_{min} et K_{max}	Valeur minimale et maximale de K déterminée avec les valeurs minimales et maximales de η	[min ⁻¹]
K_{max}	Valeur maximale de K déterminée avec les valeurs maximales de η	[min ⁻¹]
K_{2RPA}	Constante cinétique de destruction cellulaire estimée avec le modèle 2-RPA	[min ⁻¹]
K_{recirc}	Constante cinétique de destruction cellulaire estimée avec le modèle n-RPA avec recirculation	[min ⁻¹]
M	Coefficient d'extinction	[-]
MS	Matière sèche de la suspension de microalgue	[g.l ⁻¹]
M_f	Masse finale de filtre avec biomasse sèche	[g]
M_i	Masse initiale du filtre sec	[g]
M_α	Total mass of the product α in the initial biomass	[kg]
m_f	Mass of the recovery fraction	[kg]
m_f^α	Mass of the product α in the recovery fraction	[kg]
n	Fréquence d'agitation	[min ⁻¹]
N_B	Nombre de billes	[-]
N_c	Nombre de collisions entre billes	[-]
$N_j(i)$	Number of non-disrupted cells of the class i after the j^{th} pass	[Cell.ml ⁻¹]
N_p	Nombre de particules	[-]
N_{min}	Nombre minimal de cellules à compter	[Cellules]
P_i	Pression de travail i au broyage haute pression	[bar]
p	Périmètre des particules	[m]

P	Puissance consommée par le broyeur chargé en billes et suspension	[W]
P^α	Purity of the product α in the recovery fraction	[-]
P_0	Puissance consommée par le broyeur sans billes	[W]
P_s	Probabilité qu'une particule soit capturée entre deux billes et que l'intensité soit suffisante pour la casser	[-]
Q	Débit d'alimentation du broyeur	[ml.min ⁻¹]
R_α	Rayon de l'agitateur du broyeur pilote	[m]
r_p	Mean diameter of microalgal starch particles	[m]
SE	Energie de stress dans le broyeur correspondant à l'énergie cinétique maximale des billes	[J]
SE_B	Energie de stress des billes	[J]
SE_p	Energie de stress moyenne reçue par les particules dans le broyeur	[J]
\bar{SF}	Fréquence de stress moyenne fournie par le broyeur	[min ⁻¹]
SF	Fréquence de stress du broyeur	[min ⁻¹]
SI_p	Intensité de stress moyenne des particules	[J.m ⁻³]
$\bar{SI}_{p,opt}$	Intensité de stress optimale pour broyer les particules	[J.m ⁻³]
SN	Nombre de stress moyen dans le broyeur	[-]
SN_i	Nombre de stress des cellules de la classe i	[-]
SN_c	Nombre de stress reçus par cellule	[Cellule ⁻¹]
t	Durée du broyage	[min]
$t_{r,i}$	Temps réduit adimensionnel correspondant au pas de temps i	[-]
$t_{s,i}$	Temps de séjour correspondant au pas de temps i	[s]
u	Incertitude de mesure de la grandeur x	
v	Vitesse périphérique de l'agitateur	[m.s ⁻¹]
V	Volume de la chambre de broyage	[ml]
$V_{biomasse}$	Volume de biomasse filtrée pour la MS	[ml]
V_{vide}	Volume de vide dans la chambre de broyage	[ml]
x	Taille moyenne des particules de l'alimentation	[m]
X	Concentration de la culture dans le photobioréacteur	[g.l ⁻¹]

x_{min}	Taille minimale possible du matériau des particules	[m]
x_{50}	Taille moyenne de produit	[m]
Y_B	Module de Young des billes	[GPa]
Y_p	Module de Young des particules	[GPa]
Y_α	Recovery yield of the product α	[-]
z	Epaisseur du photobioréacteur	[m]

Lettres grecques

α	Taux d de recirculation	[-]
$\Delta K_{app-2RPA}$	Ecart entre K_{app} et K_{2RPA}	[min ⁻¹]
ε	Porosité du lit de billes	[-]
ε_{max}	Erreur maximale	
ζ	Taux de remplissage de la masse de billes en volume	[-]
μ_n	Moment d'ordre n de la distribution des temps de séjour	
η	Taux de destruction	[%]
$\eta_{chl a,i}$	Taux de libération de la chlorophylle a après i passages	[%]
η_{exp}	Taux de destruction expérimental	[%]
η_{max}	Limite maximale de l'intervalle de confiance de η	[%]
η_{min}	Limite minimale de l'intervalle de confiance de η	[%]
$\eta_{p i}$	Taux de libération de protéines après i passages	[%]
$\eta_{j exp}$	Taux de destruction expérimental après le passage j	[%]
$\eta_{j mod}$	Taux de destruction calculé à partir du modèle après le passage j	[%]
η_L	Viscosity of the lysate	[P.s]
ρ_P	Density of the starch particles	[kg.m ⁻³]
ρ_L	Density of the lysate	[kg.m ⁻³]
φ	Taux de remplissage des billes	[-]
σ_{CS}	Force de compression requise pour broyer le matériau des particules	[N.m ⁻²]
τ	Temps de passage dans le broyeur	[min]
ν_B	Coefficient des pertes d'énergies dues aux frictions des	[-]

	billes	
v_E	Coefficient global de pertes d'énergie dans le broyeur	[-]
v_p	Coefficient des pertes d'énergies par déformation des billes et dans les contacts sans produit	[-]
$v_{suspension}$	Facteur prenant en compte les pertes d'énergies liées à l'augmentation de la viscosité	[-]
$\overline{\Delta E}$	Ecart relatif moyen entre comptage manuel et automatique	[-]
Δt	Pas de temps	[s]

Introduction générale

La croissance de la population mondiale a engendré une augmentation des besoins en alimentation, santé, mobilité et énergie. Pour faire face à cette demande croissante, une des solutions est de développer des ressources renouvelables préservant l'environnement. Les **microalgues** sont considérées comme une ressource renouvelable de premier choix pour la production de bioénergies et de produits à plus haute valeur ajoutée tels que les protéines, sucres et lipides, pigments. En effet, elles ont pour avantage d'avoir une vitesse de croissance supérieure aux végétaux terrestres et peuvent être produites dans des eaux non conventionnelles (eau de mer, eaux saumâtres ou sur des terres arides) évitant ainsi la compétition avec les cultures vivrières. De plus, grâce à leur capacité photosynthétique, les microalgues peuvent utiliser le CO₂ de l'atmosphère ou des fumées de chaudières et participent ainsi à la réduction des gaz à effet de serre (Cheah *et al.*, 2015). Elles peuvent également être utilisées dans le traitement d'eaux usées et pour la bioremédiation des sols. En coculture avec les bactéries aérobies, elles apportent l'oxygène. Elles permettent aussi l'abattement des composés nitrates, phosphates, des métaux lourds et la réduction des bactéries coliformes dans les eaux usées. Par ailleurs, les microalgues possèdent une grande diversité d'espèces dont 40 000 identifiées contenant des composés spécifiques offrant un large potentiel à explorer (Hu *et al.*, 2008).

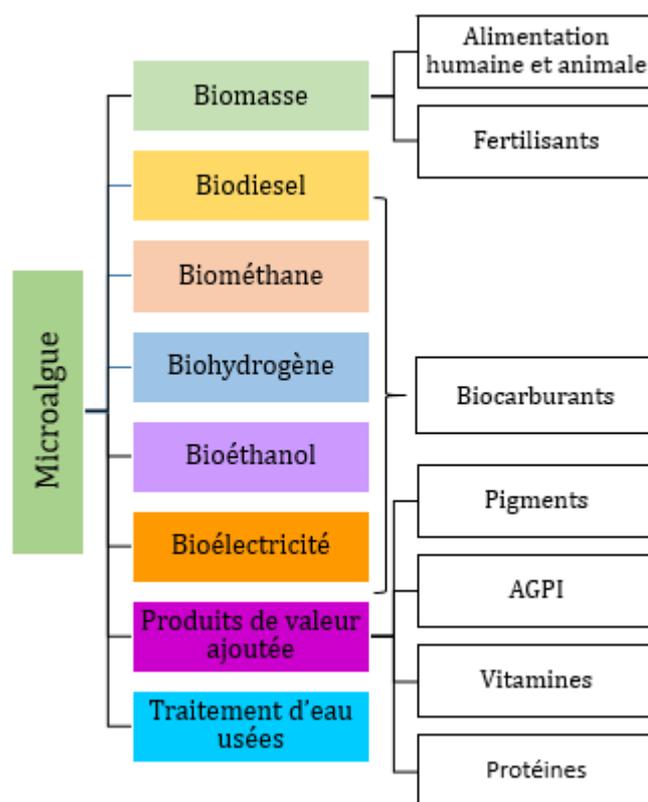


Figure 1 : Applications potentielles des microalgues modifié de (Enamala *et al.*, 2018)

La raréfaction des ressources fossiles d'énergie a augmenté l'intérêt pour la production de biocarburants dits de 3^{ème} génération, provenant de microalgues. Les études technico-économiques ont cependant révélé que pour rentabiliser la production de bioénergies à base de microalgues, les procédés doivent inclure la valorisation de produits de haute valeur ajoutée et s'intégrer à des industries existantes (Coons *et al.*, 2014; Trivedi *et al.*, 2015). Ainsi, le **bioraffinage**, défini comme étant la valorisation au sein d'un même procédé de plusieurs produits issus de la biomasse, est la voie économiquement viable de production de biocarburant de 3^{ème} génération. La gestion de l'eau et de l'humidité dans les procédés en est un autre enjeu important. Le bioraffinage de la biomasse en voie humide est ici privilégié car il permet d'économiser les coûts énergétiques importants de séchage. Une étape de **destruction cellulaire** est généralement nécessaire afin de faciliter l'accès aux biomolécules intracellulaires. Cette étape est limitante, elle détermine les rendements et la complexité des étapes de fractionnement et de purification des molécules. Dans un contexte de bioraffinage, la méthode de destruction doit aussi **préserv**er la fonctionnalité des produits et permettre une libération **sélective** des molécules. Elle doit également être facile à mettre en œuvre à grande échelle, et avoir des coûts d'investissements et opératoires réduits.

Parmi les méthodes de destruction cellulaire, le **broyage à billes** suscite de plus en plus d'intérêt. En effet, c'est une méthode qui permet d'obtenir des niveaux de destruction élevés et dont le TRL (Technology Readiness Level) est élevé (équipements à grande échelle disponibles). Le broyage à billes était initialement utilisé pour le broyage ultrafin dans les industries minérale et pharmaceutique. Son utilisation pour la destruction de microorganismes est plus récente et nécessite le développement de modèles afin de comprendre les mécanismes de broyage, de prédire les conditions opératoires et d'extrapoler les résultats. Le broyage à billes est un procédé complexe : il fait intervenir 3 phases (le fluide porteur, les billes et les microorganismes) à caractériser et des paramètres opératoires multiples (taille et densité de billes, taux de remplissage, vitesse d'agitation, mode opératoire, formulation des suspensions, ...). La plupart des études sur le broyage à billes utilisent des approches empiriques ou semi-empiriques. Les microalgues apportent une difficulté supplémentaire pour la modélisation : la structure des parois cellulaires varie selon les espèces et les conditions de culture et il n'existe pas de relation évidente entre composition de paroi et fragilité à la destruction cellulaire. De plus, au sein des cultures de microalgues, même au sein de la même espèce, la population de cellules possède des propriétés (taille, forme, état physiologique, et composition) dispersées qui impactent leur fragilité au broyage à billes.

Notre étude se propose donc de développer une méthodologie expérimentale pour modéliser la cinétique de broyage à billes applicable à différentes microalgues en utilisant

comme modèle l'espèce *Parachlorella kessleri* qui a un fort potentiel pour la production de biodiesel

Une étude préliminaire est consacrée à l'impact de l'état physiologique (phase dans le cycle cellulaire) avec la synchronisation d'une culture de *Neochloris oleoabundans*. Cette microalgue a été utilisée étant donné la disponibilité de références pour la synchronisation contrairement à *P. kessleri* qui est peu étudiée et dont les tentatives de synchronisation ont été infructueuses.

Pour la modélisation de la cinétique de broyage, sont pris en compte la disparité des microalgues en taille, l'hydrodynamique dans le broyeur à billes, ainsi que l'effet des paramètres procédés à travers un modèle de stress (décrivant la fréquence et l'énergie des stress responsables du broyage). Le modèle étudié pour *Parachlorella kessleri* a été également validé pour deux microalgues de la même famille de plus petites tailles *Chlorella vulgaris* et *Chlorella sorokiniana* qui sont également largement étudiées pour diverses applications industrielles

Des cas d'applications pour la libération des protéines et des pigments de *P. kessleri* ainsi que la récupération biomolécules après une centrifugation douce de broyats de *C. sorokiniana* ont été traités.

Enfin, l'industrialisation du broyage à billes est abordée avec la microalgue *N. oceanica* disponible en grande quantité pour des essais à l'échelle pilote et avec des suspensions concentrées.

Le manuscrit s'articule donc autour de 6 chapitres. Le premier chapitre présente l'état de l'art sur le bioraffinage des microalgues et sur la modélisation du broyage à billes. Le second chapitre détaille le matériel et méthodes de l'étude. Le 3^{ème} chapitre est consacré à l'effet de la disparité des cellules de microalgues sur la fragilité à la destruction mécanique. Le 4^{ème} chapitre concerne le développement expérimental du modèle avec les microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri*. Le 5^{ème} chapitre présente l'application de la modélisation au broyage de *C. sorokiniana* et à la récupération de biomolécules sous sa forme d'article publié. Enfin, le 6^{ème} chapitre aborde spécifiquement l'industrialisation du broyage à billes de microalgues.

Chapitre 1 : Etat de l'art sur le bioraffinage des microalgues et la modélisation du broyage à billes

Résumé :

Ce chapitre présente l'état de l'art sur le bioraffinage des microalgues, notamment les méthodes de destruction cellulaire et la place des traitements mécaniques comme le broyage à billes. Cette partie se termine par une revue de littérature sur la modélisation du broyage à billes.

INTRODUCTION.....	6
1. Bioraffinage des microalgues.....	7
1.1 Systèmes de production et de récolte des microalgues (USP).....	7
1.2 Le downstream processing (DSP).....	19
1.3 Conclusions sur le bioraffinage des microalgues.....	27
2. Les méthodes de destruction cellulaire	28
2.1 Généralités sur la destruction cellulaire	28
2.2 Méthodes chimiques et enzymatiques.....	32
2.3 Méthodes Physiques	33
2.4 Bilan sur les méthodes de destruction cellulaire.....	43
3. Modélisation de l'opération de broyage à billes	44
3.1 Approches de modélisation	44
3.2 Développement du modèle de stress.....	48
Conclusion	59

INTRODUCTION

L'objectif du bioraffinage est d'optimiser l'utilisation des ressources, de maximiser les profits et de limiter les rejets (Trivedi *et al.*, 2015). Le bioraffinage implique donc une optimisation combinée des étapes afin de préserver les propriétés de chaque produit et d'en faciliter la séparation et la purification. La biomasse microalgale comprend : des lipides, des protéines, des sucres, des pigments, des vitamines et antioxydants. Ces différentes fractions de métabolites primaires et secondaires sont valorisables dans les domaines industriels des bioénergies, de l'agroalimentaire, de la nutrition humaine et animale, de la pharmacie, des cosmétiques, des biomatériaux...(Chew *et al.*, 2017).

Dans la première partie de ce chapitre une revue bibliographique sur les étapes du bioraffinage est présentée. Les méthodes de production et de récolte des microalgues, les procédés de conversion de la biomasse en bioénergies, et les techniques de récupération et de valorisation des différentes fractions de la biomasse sont décrites.

Dans la deuxième partie, sont détaillées les technologies de destruction cellulaire et particulièrement le broyage à billes des microalgues.

Enfin, la dernière partie de ce chapitre est dédiée aux études et à la modélisation du procédé de broyage à billes.

1. Bioraffinage des microalgues

Plusieurs options sont envisageables pour les schémas de bioraffinage et le choix est fait selon la composition de la biomasse et les produits principaux ciblés (voir Tableau 1). Une unité de bioraffinage comprend généralement : la production et la récolte de la biomasse qui constituent l'« upstream processing » (USP), la destruction cellulaire, le fractionnement et la purification des produits qui constituent le « downstream processing » (DSP).

Tableau 1: Composition générale de différentes sources alimentaires humaines et des microalgues en % de matière sèche (Spolaore *et al.*, 2006)

Commodités	Protéines	Sucres	Lipides
Levure boulangère	39	38	1
Viande	43	1	34
Lait	26	38	28
Riz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Ananbaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-47	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus sp</i>	63	15	11

1.1 Systèmes de production et de récolte des microalgues (USP)

La rentabilité de l'étape de production dépend de la souche de la microalgue, de la source de CO₂, de la source des nutriments tels que l'azote et le phosphore et de la source de lumière. L'utilisation de ressources gratuites améliore la rentabilité du procédé si cela reste compatible avec la valorisation de la biomasse : cultures sur eaux résiduelles (azote, phosphore), utilisation de fumées pour le CO₂, utilisation de l'énergie solaire. Les choix doivent tenir compte de la résistance des souches et de la disponibilité des ressources.

1.1.1 Production et récolte des microalgues

1.1.1.1 Sélection des souches

La sélection des souches est la première étape d'élaboration du procédé. Elle se base généralement sur la croissance rapide des microalgues dans les conditions réelles de l'application (grande échelle, culture en photobioréacteurs (PBRs), cultures solaires, ouvertes, sur effluents...), la teneur en produits ciblés, la possibilité de valoriser des coproduits, la facilité de récolte, la facilité d'accès aux composés d'intérêts (exo-métabolites, fragilité cellulaire...) (Taleb *et al.*, 2015). Par exemple, la souche « idéale » pour le biodiesel selon Giwa *et al.*(2018) devrait avoir un taux de lipides élevé, contenir des coproduits de haute valeur ajoutée, avoir une tolérance aux variations de pH, de température, aux composés tels que les SOx et les NOx pour l'utilisation de fumées, pouvoir auto-floculer ou permettre l'utilisation de bio-floculants. Une méthode structurée de prise de décision par une approche multicritères a été évaluée par Nwokoagbara *et al.*(2015) pour la sélection de souches pour la production de biodiesel. La microalgue *Scenedesmus sp* a été retenue parmi six espèces sur les deux critères prépondérants : son taux de lipides élevé et sa croissance rapide. Parmi les 5 méthodes de prise de décision, la procédure d'analyse hiérarchique était la plus complète.

1.1.1.2 Souches d'étude et applications

- *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris est une microalgue verte de l'embranchement des Chlorophytes et de la classe des Trebouxiophyceae et du genre *Chlorella* découverte par Beyerinck (1890), de forme sphérique avec un diamètre moyen de 4 µm. Les cellules sont composées essentiellement d'un chloroplaste avec un pyrénoloïde, des thylakoïdes, de grains d'amidon et d'un noyau (Figure 2). C'est une microalgue d'eau douce caractérisée par une forte teneur en chlorophylle (1-2% de chlorophylle a) et en protéines (50-60 % de sa matière sèche) (Safi *et al.*, 2014; Spolaore *et al.*, 2006). C'est l'une des espèces les plus connues et les plus étudiées (plus de 9000 articles Elsevier en 2018) et largement utilisée en industrie grâce à sa croissance rapide et sa robustesse. Le champ d'application de *Chlorella vulgaris* est large : en alimentation, en pharmacie(compléments alimentaires),en cosmétique (crèmes anti-âge...), pour le traitement d'eaux usées et la production de bioénergies (Safi *et al.*, 2014). La paroi cellulaire des cellules matures a une épaisseur de 17-20 nm (Yamamoto *et al.*, 2005) et est composée d'une couche de glucosamine qui lui confère sa rigidité.

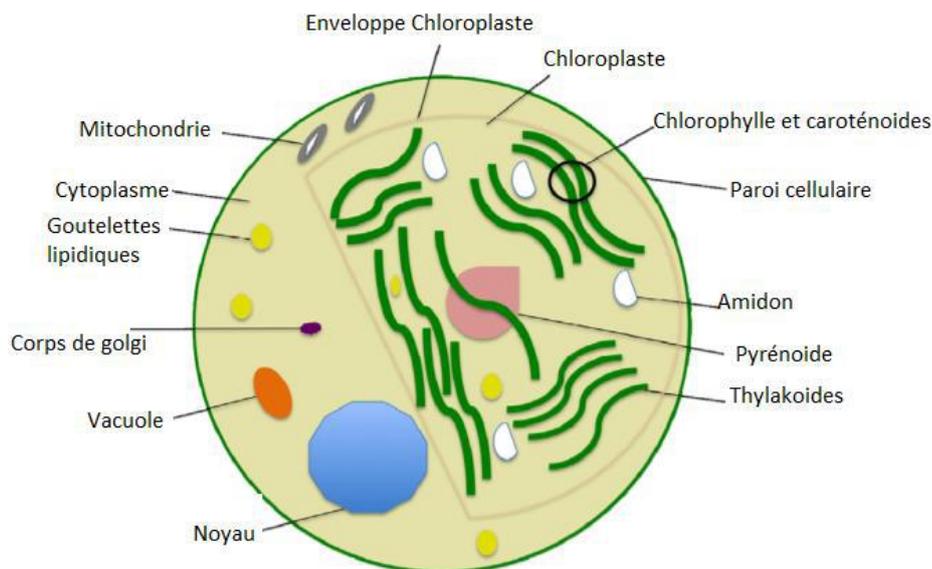


Figure 2 :Schéma de la structure d'une cellule de *C. vulgaris* d'après (Safi *et al.*, 2014)

- *Chlorella sorokiniana*

Chlorella sorokiniana est également une espèce sphérique de 2 à 8 μm selon les conditions de culture (Azaman *et al.*, 2017). Elle offre plusieurs possibilités d'applications. Elle est étudiée pour sa capacité à accumuler de l'amidon (Gifuni *et al.*, 2018), pour son potentiel d'abattement de pollution organique azotée et phosphatée des eaux usées (Kim *et al.*, 2013; Murwanashyaka *et al.*, 2017) et sa capacité à s'adapter aux fluctuations de la charge polluante (Shriwastav *et al.*, 2014). Sa capacité à capter le CO_2 provenant de gaz de combustion tout en accumulant des lipides a été montrée par Kumar *et al.* (2014). La souche génétiquement modifiée *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 cultivée en deux étapes (mixotrophie puis en phototrophie) a également été étudiée pour la production de lutéine ($16,2 \text{ mg.l}^{-1}.\text{j}^{-1}$) (Chen *et al.*, 2018a ; Chen and Liu, 2018).

- *Parachlorella kessleri*

Appartenant également à la classe des Trebouxiophyceae, le genre *Parachlorella* initialement rattaché au genre *Chlorella*, a été décrit par Krienitz *et al.*(2004). *Parachlorella kessleri* est une microalgue d'eau douce de forme globulaire ou ovoïde de diamètre compris entre 4-10 μm parfois recouverte d'une gangue gélatineuse. Sa reproduction se fait par auto-sporulation de 2, 4, 8 ou 16 autospores (Krienitz *et al.*, 2004). Espèce encore peu étudiée, *Parachlorella kessleri* a néanmoins révélé un fort potentiel pour la production de biodiesel. En effet, elle a une croissance relativement rapide en photobioréacteurs, une teneur en lipides élevée en carence azotée (Taleb *et al.*, 2015). De plus, en comparaison avec le genre *Nannochloropsis*, *P. kessleri* a une plus grande fragilité à la destruction mécanique et une taille de cellule plus importante (facilitant la récolte) (Ota *et al.*, 2016; Taleb *et al.*, 2015). Elle possède

une paroi cellulaire épaisse (Tableau 2), lui conférant une grande rigidité. Elle est également étudiée pour le traitement d'eaux usées issues de la digestion anaérobie (Koutra *et al.*, 2018). Les travaux de Heo *et al.*(2018) ont également montré des résultats prometteurs pour la production de lutéine avec une productivité de 25 mg.l⁻¹ par jour avec le genre *Parachlorella*.

Tableau 2 : Comparatif des propriétés des parois cellulaires de *C. vulgaris*, *P. kessleri* et de *C. sorokiniana* (modifié de Yamamoto *et al.*, 2005)

Caractéristiques	<i>C. vulgaris</i>	<i>C. sorokiniana</i>	<i>P. kessleri</i>
Sucres de la paroi rigide	Glucosamine	Glucosamine	Glucosamine
Epaisseur moyenne de la paroi (nm)	17-20	22	54-69
Densité électronique de la paroi	Dense	Dense	Transparente
Anisotropie de la paroi cellulaire	-	+	-
Synthèse des parois des cellules filles	Précoce	Précoce	Tardive

- *Neochloris oleoabundans*

Espèce appartenant également à l'embranchement des Chlorophytes, *Neochloris oleoabundans* fait partie de la classe de Chlorophycées. C'est une microalgue d'eau douce sphérique de taille comprise entre 2-6 µm (de Winter *et al.*, 2013a). Comme son nom l'indique, c'est une algue caractérisée par sa teneur naturelle en lipides élevée (23% de sa matière sèche MS). Cultivée dans des conditions de carence azotée, elle augmente sa teneur en lipides jusqu'à 35-54% dont 18% de triacylglycérides (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008; Pruvost *et al.*, 2009). Par ailleurs, on peut valoriser ses caroténoïdes comme coproduits de la production de biodiesel (Urreta *et al.*, 2014; Reyes *et al.*, 2016).

- *Nannochloropsis oceanica*

Nannochloropsis oceanica est une microalgue marine de petite taille (2-5µm)(Dong *et al.*, 2013)de l'embranchement des Ochrophyta et de la classe des Eustigmatophyceae (Suda *et al.*, 2002). C'est une microalgue oléagineuse étudiée pour son potentiel pour la production de biodiesel (Taleb *et al.*, 2015) et pour sa propension à accumuler l'acide eicosapentaénoïque (EPA). Chen *et al.*(2018b) ont obtenu jusqu'à 4,1 % en matière sèche d'EPA dans une culture avec une eau de mer profonde (recueillie à plus de 200m).

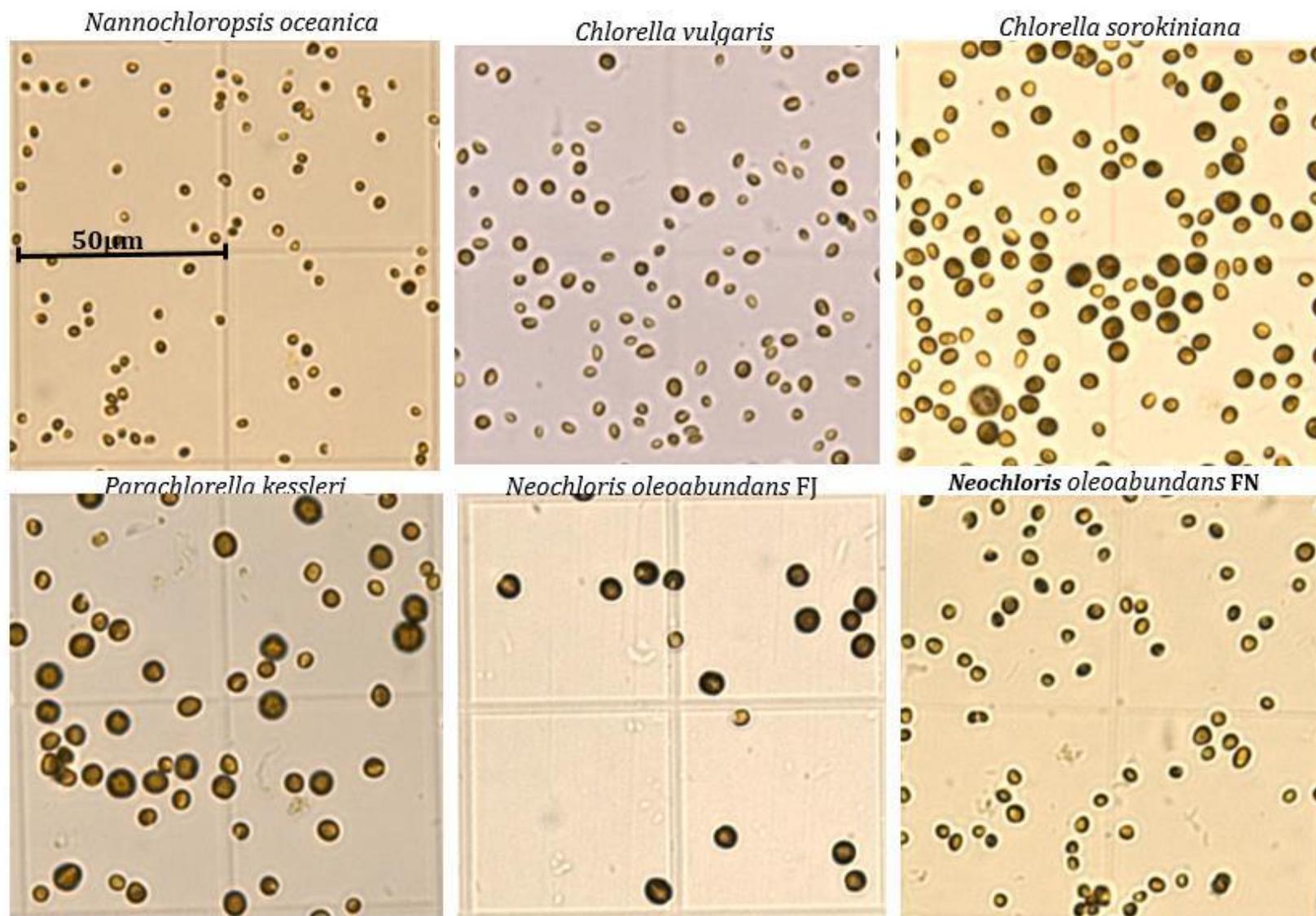


Figure 3: Photos des microalgues colorées au Lugol prises au grossissement $\times 400$ sur des cellules de Malassez : FJ : cellules mères de *N. oleoabundans* obtenues par synchronisation de la division ; FN : cellules filles

1.1.1.3 Méthodes de production des microalgues

- Systèmes de production conventionnels

Les microalgues sont généralement produites dans des systèmes ouverts, les raceways et lagunes ou dans des systèmes fermés appelés photobioréacteurs (PBRs) (Figure 4 c, d, e et f).

Selon la géométrie, on peut classer les PBRs en trois catégories : les PBRs tubulaires, les colonnes, les réacteurs plans. Par rapport aux systèmes ouverts, les PBRs ont l'avantage de permettre un contrôle et une optimisation des conditions physico-chimiques (pH, salinité, température, nutriments) de culture en fonction des souches, d'avoir des transferts de matière élevés, de protéger les cultures de contaminations externes et de limiter les pertes d'eau par évaporation. Cependant, ces technologies demandent de lourds investissements pour une production à grande échelle et une maintenance complexe à cause de l'encrassement.

En revanche, les bassins ouverts sont moins chers, plus simples à mettre en œuvre, mais sont en proie aux fluctuations de la lumière solaire, de la température et aux risques de contamination. Le choix du système de production dépend de la taille des unités, des contraintes normatives liées aux produits visés, de la disponibilité des matières premières et de la robustesse des espèces cultivées (Tan *et al.*, 2015).

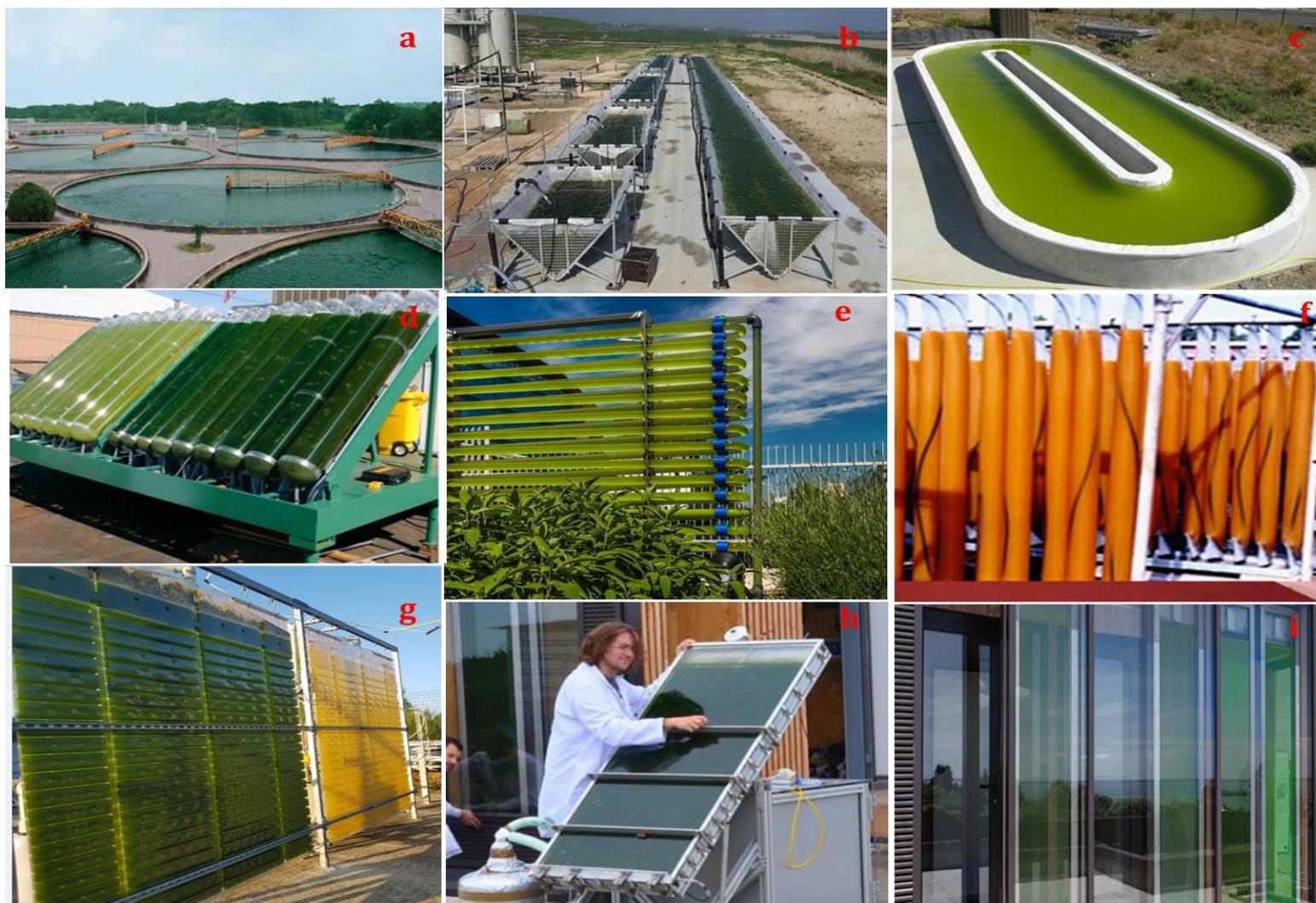


Figure 4: Exemples de systèmes de production des microalgues: **a** systèmes de lagunes en Indonésie (sunchlorella.com); **b** système ouvert (www.universe-biofuel.com); **c** raceways ouverts (LBE Montpellier, France); **d** PBRs cylindriques inclinés (<http://micro-algues-tpe.eklablog.com/>); **e** PBRs tubulaires (ennesys.com); **f** Systèmes tubulaires (www.minapro.com); **g** PBRs airlift Subitec (photo prise sur la plateforme Algosolis, France); **h** PBRs plan inclinés (algosolis.com); **i** PBR de façade (algosolis.com, projet SYMBIO₂)

- Paramètres opératoires de la culture des microalgues (Pruvost *et al.*, 2016)

La lumière, la source de carbone, les nutriments minéraux, la température et le pH sont les paramètres fondamentaux susceptibles de limiter la croissance photosynthétique des microalgues. A part la lumière, les autres paramètres peuvent être contrôlés et réglés aux valeurs optimales selon les espèces cultivées.

La température a un effet direct sur la croissance des microalgues étant donné son influence sur les réactions métaboliques. La régulation thermique est nécessaire particulièrement pour les cultures solaires qui peuvent subir des surchauffes en été ou des températures très basses en hiver (ou bien entre le jour et la nuit). La méthode de régulation couramment utilisée est le refroidissement et chauffage par l'eau (Pruvost *et al.*, 2016). Les échanges thermiques entre photobioréacteurs de façades et bâtiments sont une alternative pour la réduction des coûts de régulation thermiques (50-200 Wm⁻²).

Les apports en nutriments peuvent être maîtrisés lorsque la composition de la microalgue est connue. Le milieu doit apporter en quantité suffisante les macroéléments (C, N, S, P) et microéléments (Fe, Mg, Ca...) pour atteindre une concentration donnée en biomasse. Les limitations en éléments minéraux peuvent être aisément évitées en connaissant la composition des microalgues cultivées et assurant un bon transfert de matière du milieu de culture aux cellules.

La source de carbone utilisée par les microalgues peut être directement le CO₂ aqueux ou provenir de la réaction de dissociation du bicarbonate. Certaines microalgues ont la capacité d'utiliser à la fois du CO₂ aqueux ou du bicarbonate mais la présence de CO₂ aqueux reste indispensable. Le ratio CO₂ aqueux et HCO₃⁻ dépend du pH : à des pH >6,3 la conversion de HCO₃⁻ en CO₂ aqueux est rapide et la consommation de CO₂ aqueux entraîne une augmentation de pH. La régulation de pH par bullage de CO₂ est souvent utilisée pour rétablir l'équilibre.

Les conditions hydrodynamiques sont à prendre en compte dans la conception des PBRs. Elles sont déterminantes pour les contraintes de cisaillement (seuils de fragilité de certaines souches), l'amélioration du transfert de chaleur et de matière (CO₂, dégazage de l'O₂), pour les fluctuations dynamiques des cellules entre zones sombres et claires et pour éviter la sédimentation des cellules et la formation de biofilms.

La concentration en biomasse a un impact direct sur les régimes d'atténuation de la lumière. Lorsque les PBRs sont opérés en batch ou en semi-continu, les concentrations et donc les conditions d'atténuation évoluent continuellement. En mode continu, on peut atteindre un régime permanent (tous les paramètres opératoires maintenus constants dans le temps). Le choix du taux de dilution détermine alors les conditions d'atténuation de la lumière et la productivité. Si la concentration en biomasse est trop basse (taux de dilution élevé), une partie

des photons n'est pas absorbée par la culture et est directement transmise conduisant à une perte d'énergie (Figure 5.c). On parle de régime cinétique d'atténuation de lumière. La lumière reçue par cellule est élevée et peut conduire à une plus grande dissipation de l'énergie photosynthétique ou à une réduction de la teneur en pigments qui rend les cultures instables avec des risques de lessivage. Lorsque la concentration est élevée (Figure 5.a), des zones sombres dans lesquelles les cellules ne reçoivent pas assez de lumière apparaissent : l'irradiance reçue par les cellules est inférieure à l'irradiance de compensation G_c (irradiance minimale pour assurer une croissance photosynthétique nette positive). Par conséquent, la productivité en biomasse est diminuée à cause de la respiration. Il s'agit du régime de photo-limitation dans lequel fonctionnent généralement les PBRs.

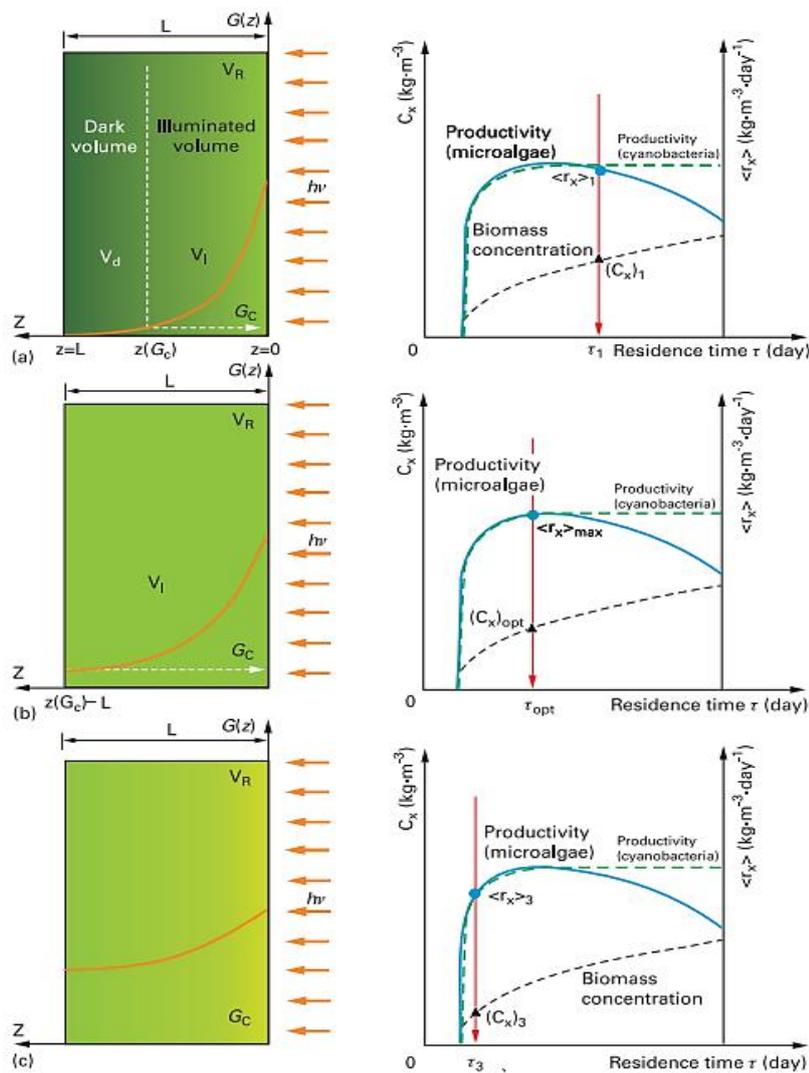


Figure 5: Différents régimes d'atténuation de la lumière dans les PBRs en fonction de l'irradiance $G(z)$ et productivités volumétriques de biomasse correspondantes ($\langle r_x \rangle$): (a) régime de photo limité ; (b) régime d'absorption totale ; (c) régime cinétique (Pruvost and Cornet, 2012)

Pour atteindre la productivité optimale dans les PBRs en continu, le taux de dilution doit être choisi pour permettre l'absorption complète de la lumière par la culture sans apparition de zones sombres. On parle alors de luminostat ou de régime d'absorption totale (Figure 5.b).

1.1.1.4 Nouvelles tendances de production

L'eau de mer profonde est une eau recueillie dans les océans à plus de 200m en dessous de la surface. Ces eaux sont caractérisées par une basse température, taux de nutriments élevés, propriétés antiseptiques et peu de bactéries et de virus y survivent. L'utilisation de 50% d'eau de mer profonde avec un milieu de culture a permis de produire de la biomasse de *C. sorokiniana* à 2,4 g.l⁻¹. Cependant, l'exploitation de ces eaux nécessite de gros investissements dans des systèmes de pompage. De tels systèmes existent déjà au Japon et à Hawaï et ont permis l'utilisation de ces eaux pour l'aquaculture, l'agriculture, la médecine (Tan *et al.*, 2015).

Par ailleurs, les microalgues peuvent être cultivées avec des bactéries promotrices de croissance. Par exemple, les bactéries de type *Azospirillum* sont connues pour améliorer la croissance des plantes grâce à la sécrétion d'hormones. La microalgue *Chlorella vulgaris* a été co-immobilisée avec l'espèce *Azospirillum brasilense* dans des billes d'alginate : la croissance des cellules en a été améliorée et maintenue à des pH supérieurs à 8 qui normalement sont inhibiteurs (Tan *et al.*, 2015).

1.1.1.5 Méthodes de récolte des microalgues

La récolte des microalgues est une étape incontournable qui peut coûter jusqu'à 20-30 % des coûts de production pour des cultures diluées (Barros *et al.*, 2015). Elle peut être effectuée soit en une seule étape soit en deux étapes : l'épaississement qui concentre les cultures à un taux de matière en suspension entre 2 et 7 % et la déshydratation qui mène à 15-25 % (Uduman *et al.*, 2010). Les méthodes de récoltes peuvent être classifiées en : méthodes mécaniques, méthodes électriques, méthodes chimiques et méthodes biologiques. Ces méthodes peuvent être combinées pour réduire les coûts. La difficulté de récoltes des microalgues est due à leur petite taille, leur faible densité, aux suspensions stables qu'elles forment à cause de leur charge négative et aux cultures de départ généralement diluées.

- **Méthodes d'épaississement (ou de dewatering)**

Les méthodes d'épaississement regroupent : la coagulation/floculation, la sédimentation gravitaire, la flottation et les méthodes électriques.

La coagulation consiste en la déstabilisation des suspensions des microalgues par ajout d'un électrolyte ou par ajustement du pH. La floculation est induite par des polymères (cationiques généralement) selon trois mécanismes possibles : la création de liaisons avec des particules de charges opposées ; la création de ponts entre les particules ou le piégeage des particules par précipitation massive. L'efficacité des méthodes de coagulation/floculation dépend de la taille

des microalgues, de leurs propriétés de surface (hydrophobicité, charge nette) et de leur concentration. Les coagulants usuels sont les sulfates de fer $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ et d'alumines $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$. Les sulfates ferriques ne sont pas utilisables pour les procédés de valorisation de pigments car ils donnent une coloration (jaune-brune) aux algues. Les sels d'aluminiums sont préférés mais induisent entre 10-15 % de lyse cellulaire. L'utilisation de coagulants naturellement présents dans les eaux usées, saumâtres ou de mer tels que les ions phosphates, carbonates, magnésium et calcium présents pourrait permettre de réduire les coûts. On peut également envisager l'utilisation de calcaires et de dolomites riches en ions (magnésium, carbonates, hydroxydes) ayant une activité coagulante par modification du pH. Les polymères cationiques (chitosane, surfactants, les polyacrylamides cationiques...) sont efficaces étant donné la charge nette négative des cellules. Leurs performances peuvent cependant être réduites pour des milieux de salinité supérieure à 5 g.l^{-1} (Uduman *et al.*, 2010; Barros *et al.*, 2015). Le chitosane est un biopolymère abondant et non toxique (Renault *et al.*, 2009) dont l'efficacité pour la récolte des microalgues a été prouvée (Kurniawati *et al.*, 2014; Rashid *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). Un floculant potentiel évitant la contamination et approuvé pour des applications alimentaires est l'amidon cationique qui a été efficace à flocculer les microalgues *Scenedesmus obliquus* et *Parachlorella kessleri* (Vandamme *et al.*, 2010).

L'auto-floculation est une méthode biologique due à la sécrétion par les microalgues d'exopolymères (EPS) jouant le rôle de floculant ou à une floculation induite par l'augmentation de pH (liée à la consommation du CO_2 ou à l'ajout de NaOH). L'induction de l'auto-floculation par ajout de NaOH est plus efficace dans l'eau de mer car la présence des ions divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) provoque la formation de précipités qui accélèrent la sédimentation des microalgues (Barros *et al.*, 2015).

La bio-floculation désigne quant à elle, la production de bio-floculants par des microorganismes mis en coculture avec les microalgues (levures, bactéries, microalgues auto-floculantes). Elle permet d'éviter l'ajout d'additifs chimiques mais peut entraîner des contaminations empêchant l'utilisation de la biomasse microalgale à des fins alimentaires. Par exemple, la coculture avec des bactéries des genres *Flavobacterium*, *Terrimonas* et *Sphingobacterium* a permis de former des floccs d'environ $100 \mu\text{m}$ au lieu de floccs de $20 \mu\text{m}$ formés dans des cultures axéniques de *Chlorella vulgaris* (J. Lee *et al.*, 2013). La coculture avec des bactéries peut cependant nécessiter l'addition de coagulants chimiques pour augmenter l'efficacité. La coculture avec des microalgues floculantes est une option à favoriser puisqu'elle permet une valorisation totale de la biomasse. La coculture des microalgues avec des champignons filamenteux permet également d'avoir des floccs jusqu'à 2-5 mm. De plus, certains champignons contiennent jusqu'à 30 % de lipides. Cette méthode déjà utilisée dans le traitement

d'eaux usées est également une intéressante alternative pour la production de biodiesel et pour le traitement d'eaux usées par les microalgues (Barros *et al.*, 2015).

La sédimentation gravitaire est la méthode la plus basique mais requiert de longs temps de traitement car les microalgues ont des vitesses de sédimentation souvent faibles (0,1-2,6 cm.h⁻¹). Une étape de coagulation/floculation est souvent mise en amont de la sédimentation gravitaire (Barros *et al.*, 2015).

La flottation (sédimentation inversée) est plus aisée que la sédimentation gravitaire étant donné la petite taille et la faible densité des cellules de microalgues. C'est une méthode utilisée à grande échelle et qui requiert un temps relativement court. Il existe 4 techniques de flottation : la flottation par air dissous (bulles <100µm) ; la flottation par air dispersé (bulles entre 100-1000µm), la flottation électrolytique (formation de fines bulles d'hydrogène par électrolyse) et la flottation par ozone dispersée (bulles chargées interagissant avec les microalgues chargées positivement). Le procédé par air dissout est le plus utilisé et le plus efficace mais est énergivore. La flottation par dispersion d'air consomme moins d'énergie mais requiert un investissement coûteux en système d'injection et d'agitation à haute vitesse (Uduman *et al.*, 2010;Barros *et al.*, 2015).

Les procédés électriques regroupent l'application de champs électriques permettant de séparer les microalgues qui précipitent sur les électrodes (électrophorèse) ou décantent par électro-floculation et l'électro-flottation. L'électrocoagulation peut être couplée à l'électro-flottation. Soit les ions métalliques émis par une anode sacrificielle (aluminium, fer) jouent le rôle de coagulants, (coagulation électrolytique) soit les microalgues atteignent l'anode, perdent leur charge et forment des floccs (floculation électrolytique). Les fines bulles d'oxygène et d'hydrogène générées respectivement à l'anode et à la cathode entraînent les floccs formés (Gao *et al.*, 2010; Uduman *et al.*, 2010).L'utilisation des méthodes électriques de coagulation/floculation permet, particulièrement celles sans électrodes sacrificielles, d'éviter la contamination des microalgues par des additifs.

- **Les méthodes de déshydratation**

La déshydratation des boues de microalgues est essentiellement obtenue par filtration ou par centrifugation.

La filtration est généralement l'étape consécutive à la coagulation/floculation. La principale difficulté de la méthode est liée à l'encrassement qui augmente les coûts d'entretien et de remplacement. Le flux d'opération doit être inférieur aux flux critique (flux entraînant un dépôt irréversible du gâteau). L'encrassement peut malgré tout se former progressivement en particulier pour des microalgues produisant des EPS (exo polysaccharides). La filtration comme technique de déshydratation est faisable uniquement pour des microalgues de grande taille ou

qui forment de larges colonies. La filtration tangentielle est plus appropriée aux microalgues de petites tailles tandis que la filtration frontale est adaptée aux plus grosses (>70 µm). Même si elle permet de récolter les microalgues de faible densité, la filtration n'est aujourd'hui économiquement viable qu'à petite échelle à cause des charges de remplacement des membranes et de pompage. La microfiltration (pores entre 0,1-10 µm) peut être moins coûteuse que la centrifugation pour des charges inférieures à 2 m³.j⁻¹ (Rossignol *et al.*, 1999; Molina Grima *et al.*, 2003).

La centrifugation est la méthode la plus rapide mais la plus énergivore pour concentrer les suspensions de microalgues. Son utilisation est souvent limitée aux produits de haute valeur ajoutée tels que les acides gras polyinsaturés, les ingrédients pharmaceutiques et cosmétiques. Elle peut être efficace en concentration directe ou après épaissement pour la plupart des microalgues. Les conditions de centrifugation sont généralement choisies pour maximiser la récupération de biomasse. Une économie considérable pourrait pourtant être faite en réduisant le taux de récupération: une réduction de 82 % de la consommation d'énergie a été réalisée en récupérant 29 % au lieu de 94 % de la biomasse (Dassey and Theegala, 2013). En prétraitant les suspensions par coagulation/floculation les coûts peuvent être réduits et des facteurs de concentrations augmentés jusqu'à 3,8 fois (Schlesinger *et al.*, 2012).

Plusieurs méthodes sont efficaces pour récolter les microalgues. Le coût est un critère important dans le choix de la méthode. Il peut être réduit en combinant les méthodes de pré concentration avec les méthodes de déshydratation (Tableau 3). Les aspects de durabilité et d'impacts environnementaux doivent également être pris en compte dans le choix (Deconinck *et al.*, 2018). Une meilleure compréhension des méthodes biologiques (bio-floculants, coculture avec des microorganismes floculant) et des mécanismes permettant à certains organismes d'auto-floculer permettrait une avancée importante et d'envisager par exemple des modifications génétiques pour induire l'auto-floculation de certaines espèces (Barros *et al.*, 2015).

1.2 Le downstream processing (DSP)

1.2.1 *La conversion de la biomasse en bioénergies*

Les méthodes de conversion de la biomasse microalgale pour la production de bioénergies peuvent être regroupées en quatre principales catégories selon Chew *et al.* (2017): les méthodes thermochimiques, les méthodes biochimiques, la transestérification et les photobiopiles.

Tableau 3 : Harvesting methods overview: comparison based on strain limitation, final total suspended solids concentration (TSS), capital expenditures (CAPEX), operational expenditures (OPEX), energy demand and greenhouse gas emission (GHG) (Deconinck *et al.*, 2018)

Harvesting method	Strain limitation	TSS (%)	CAPEX (\$ m ⁻³)	OPEX (\$ m ⁻³)	Energy (kWh m ⁻³)	GHG (gCO ₂ -eq MJ ⁻¹)	Scale ^a
<i>Primary concentration/separation</i>							
Sedimentation	High	0.5–3	0.03	0.05–0.39	0.05–0.1	2.11–28	Pilot
Auto/co-flocculation/biofilms ^b	Medium	1.4–5	0.03	0.06–1.5	0.02–0.2	10	Pilot
Inorganic flocculation	Low	1.2–7	0.36	0.53–2.26	0.00084–2.85	1.26–36	Pilot
Organic flocculation	Medium	0.6–15	0.26	0.1–21.45	0.1–14.81	8.88–56	Lab
Electrolytic flocculation	Low	3–5	0.05–6.03	0.11–1.45	0.04–9.5	47.9	Bench
Magnetic flocculation	Medium	4.4	1.02	0.62	6.5	65	Lab
Hydrocyclone	High	0.4	4.32	1.87	0.3	160	Bench
Dissolved air flotation (DAF)	Medium	1–8	1.46	0.26–1.80	0.6–20	57.8–80	Pilot
Electrolytic flotation	Medium	3–5	1.07	0.65	0.3–2	47.9	Bench
Suspended air flotation (SAF) ^c	Medium	1.4–5	1.04	0.65	0.003–0.015	70–90	Pilot
Microstrainer filtering	High	1.5–3	0.05	0.02	0.02–0.5	50	Pilot
Acoustic aggregation	low	7.6	2.6	0.65	16–40	47.4	Lab
<i>Secondary concentration/separation</i>							
Decanter	Medium	12–30	0.58–1.75	0.39–1.13	3.6–10.8	39–80	Bench
Disk stack centrifugation	Medium	10–22	0.48–0.55	0.2–1.63	0.7–1.4	53–398.48	Bench
Spiral plate rotor (SPR)	Low	31.5	0.41–0.78	0.2–0.39	0.42–1.94	242	Pilot
Membrane filtration/TFF ^d	Medium	2–27	1.87	0.35	0.012–10	40–45.4	Bench
Belt filtering	High	12–50	0.29–0.88	0.18–0.57	0.16–0.88	20–79	Pilot
Chamber filtering	High	5–27	0.19	0.07	0.88	1.65–241.87	No data
Vacuum belt filtering	High	9.5–18	0.42	0.18	0.1–5.9	92.5	Pilot
Vibrating screen filtering	Medium	1–10	0.62	0.19	0.4–3	70.5	Pilot

^a Lab: volumes < 10 gal, bench: volumes 10–1000 gal, pilot: volumes > 1000 gal [30].
^b Auto- and co-flocculation are taken together; biofilms on substrata are included in this category.
^c Hydrophobic layer separation included.
^d Micro- and ultra-filtration and Tangential Flow Filtration (TFF) are combined.

1.2.1.1 Les méthodes thermochimiques

Elles désignent la décomposition thermique des composés organiques de la biomasse pour en extraire les fuels. La biomasse peut être transformée par gazéification (800-1000°C) transformant les composés carbonés en gaz de synthèse (mélange de CH₄, CO₂, H₂ et de CO) utilisés comme combustibles pour une utilisation domestique et pour les machines et turbines à gaz. Par liquéfaction thermochimique, la biomasse humide est directement transformée en bio huile à haute température et haute pression. La pyrolyse est la dégradation thermique (350-700°C) en absence d'oxygène pour former des bio-huiles. Une pyrolyse rapide peut être obtenue à température modérée (500°C) et des temps de séjour de vapeur chaude de l'ordre d'1s et permet d'avoir des rendements élevés en bio huiles (95 %). Par ailleurs, la biomasse (avec une humidité < 50 % de matière sèche) peut être utilisée par combustion directe en présence d'air dans des fours, chaudières et turbines à vapeur.

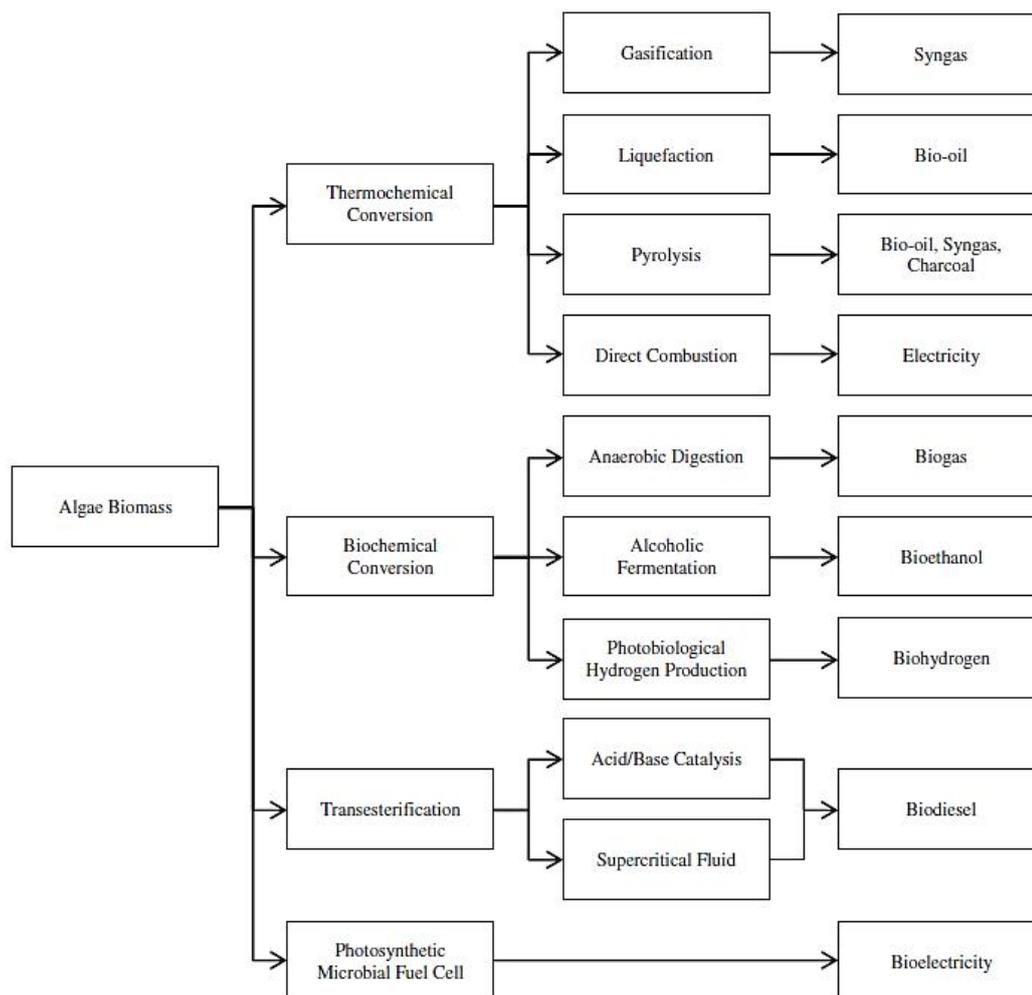


Figure 6 : Principales voies de transformation de la biomasse des microalgues en source d'énergie (Tan *et al.*, 2015)

1.2.1.2 Les méthodes biochimiques

Elles concernent la transformation de la biomasse par des microorganismes. Par exemple, la digestion anaérobie de la biomasse permet de produire du biométhane et la fermentation alcoolique des sucres (cellulose, glucose et amidon) contenus dans la biomasse produit du bioéthanol. Certaines microalgues possèdent des gènes leur permettant de produire de l'hydrogène et d'autres sont génétiquement modifiées pour en produire. D'abord une croissance photosynthétique des algues aboutit à la formation d'oxygène et d'ions H^+ qui sont ensuite réduits en conditions anaérobies par des hydrogénases en H_2 . La microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* est une espèce modèle utilisée pour la photo-bioproduction d'hydrogène.

1.2.1.3 La transestérification

Il s'agit de la transformation des triglycérides et d'alcool en présence de catalyseur pour la production d'esters d'acides gras et de glycérol. La transestérification peut être obtenue par catalyse acide, alcaline ou enzymatique ou par des méthodes utilisant des fluides supercritiques.

La transestérification par catalyseurs alcalins tels que le NaOH et le KOH est 4000 fois plus rapide que l'utilisation des acides. L'utilisation d'alkoxydes tels que le méthoxyde de sodium est encore plus efficace mais est plus coûteuse. L'utilisation de lipases présente l'avantage de transformer dans des conditions douces les lipides et de simplifier les étapes de purification du biodiesel mais les coûts des lipases sont élevés (Chisti, 2007; Tan *et al.*, 2015; Trivedi *et al.*, 2015; Chew *et al.*, 2017). L'utilisation de fluides (solvants organiques, CO₂) supercritiques (250-350°C) est moins coûteuse que les méthodes catalytiques car permettent l'utilisation d'un seul équipement pour l'extraction et la transformation des lipides en biodiesel (Tan *et al.*, 2015).

1.2.1.4 Les photobiopiles

Dans les photobiopiles, la biomasse des microalgues n'est pas transformée mais utilisée à l'anode pour produire des électrons (souche modifiée de *Chlamydomonas reinhardtii*) ou en tant que substrat pour les bactéries et à la cathode comme biocatalyseurs des réactions de réduction en produisant l'oxygène requis. Les microalgues *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Pseudokircheneriella subcapitata* et les cyanobactéries *Arthrospira platensis* et du genre *Anabaena* sont celles qui ont été étudiées dans les photobiopiles.

La Figure 7 illustre le principe de fonctionnement d'une photobiopile catalysée par les microalgues.

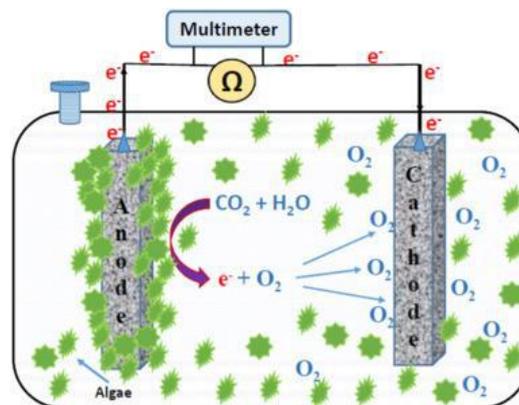


Figure 7: Schéma de principe d'une cellule de photobiopile catalysée par des microalgues (Enamala *et al.*, 2018)

1.2.2 Récupération et valorisation des différentes fractions de la biomasse :

La biomasse algale est composée de protéines, lipides, sucres, pigments, vitamines...Chaque fraction possède plusieurs applications potentielles (Tableau 4) et des méthodes d'extraction propres pour les récupérer sont connues.

Tableau 4:Récapitulatif de la valorisation des différentes fractions de la biomasse des microalgues (Trivedi *et al.*, 2015; Chew *et al.*, 2017; Khanra *et al.*, 2018; Maeda *et al.*, 2018)

Catégorie	Produits	Sources	Applications
Protéines	Poudre ou tablettes	<i>Athrospira. sp, Chlorella. sp</i>	Compléments alimentaires Nutrition animale et aquaculture
Sucres	- Agar - Carraghénane - Alginate - Fucoïdane	<i>Algues rouges et brunes</i> Ex : <i>P. cruentum</i>	Préparation milieu de culture, agents stabilisants, épaississants, émulsifiants anticoagulants, anti tumeurs, antiviraux, industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques
Pigments	- Phycocyanine - β-Carotène - Astaxanthine - Lutéine - Chlorophylle	- <i>A. platensis</i> - <i>D. salina</i> - <i>H. pluvialis</i> - <i>D. salina</i> - <i>Chlorella. sp</i>	Colorants naturels, cosmétique, provitamines, prévention de maladies
Acides gras polyinsaturés	- Acide eicosapentaénoïque (EPA) - Acide arachidonique (ARA) - Acide docosahexaénoïque (DHA)	<i>Nannochloropsis. sp</i> <i>Chlorella sp</i> <i>Schizochytrium sp.</i> <i>Parietochloris incisa</i>	Compléments alimentaires, nutraceutique
Vitamines	- Biotine - Vitamine C - Vitamine E - Vitamine B12 - Riboflavine	- <i>Euglena gracillis</i> - <i>Chlorella. sp</i> et <i>Prototheca moriformis</i> - <i>Hapalosiphon fontinalis</i> , <i>Tolypothrix tenuis</i> , <i>cylindrospermum sp</i>	Nutrition humaine ou animale, compléments alimentaires

1.2.2.1 Lipides

Les microalgues peuvent accumuler entre 30-50 % de leur matière sèche en lipides (Tableau 5). Leur teneur en lipides peut être supérieure à la plupart des plantes terrestres oléagineuses. Les profils lipidiques et la teneur en lipides dépendent des conditions de culture et des espèces. La carence en azote, les hautes températures, le changement de pH et la forte salinité sont les conditions favorisant l'accumulation des lipides. Les lipides peuvent être valorisés dans la production de biodiesel (acides gras saturés, et triacylglycérides) ou comme complément alimentaires et ingrédients pharmaceutiques (acides gras polyinsaturés AGPI).

Tableau 5: Exemples de microalgues à fortes teneurs en lipides (Chisti, 2007; Taleb *et al.*, 2015)

Microalgues	Teneur en lipides (%) MS
<i>Botryococcus braunii</i>	25-75
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31-68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35-54
<i>Nitzschia sp.</i>	45-47
<i>Schizochytrium sp.</i>	50-77
<i>Parachlorella kessleri</i>	41-65

L'extraction des lipides des microalgues implique généralement l'utilisation de solvants organiques tels que les alcanes (hexane, heptane), les alcools (méthanol, éthanol, propanol) solvants chlorés (chloroforme, dichlorométhane), et solvants alternatifs tels que le CO₂ supercritique, éthers, esters (Angles *et al.*, 2017) et les terpènes. Elle peut être améliorée en combinant l'action des ultrasons, des microondes ou l'électroporation. Les procédés d'extraction demandent généralement beaucoup d'énergie et ont un impact environnemental à cause de l'utilisation de solvants provenant des ressources fossiles. Le choix des solvants doit se baser sur la capacité d'extraction, la facilité de recyclage et la non toxicité (Angles *et al.*, 2017). L'extraction avec le CO₂ supercritique est une méthode alternative qui nécessite néanmoins la prise en charge d'un fluide supercritique nécessitant des coûts d'investissement et opératoires élevés. Des méthodes sans solvant ont également été développées : l'extraction enzymatique, l'utilisation des chocs osmotiques, l'extraction isotonique. Ces méthodes permettent la réutilisation du résidu d'extraction pour l'alimentation (Chew *et al.*, 2017).

Les acides gras sont des acides carboxyliques constitués d'un radical R (chaîne carbonée) et d'un groupe carboxylique COOH. Les acides gras polyinsaturés (AGPI) possèdent au moins deux doubles liaisons dans la chaîne carbonée. Les AGPI de type oméga 3 et oméga 6 sont des

composés essentiels qui ont des rôles biologiques fondamentaux. L'acide arachidonique (ARA) du groupe des oméga 6 a un rôle structurel dans les organes, le sang et les muscles ; les oméga 3 tels que l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) permettent la prévention des maladies cardio-vasculaires. Avec la raréfaction des poissons et l'augmentation des besoins en alimentation, les microalgues sont devenues une source privilégiée d'AGPI polyinsaturés étant donné que ces acides gras essentiels sont rarement retrouvés dans les autres cultures (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013).

Les AGPI sont extraits par les méthodes classiques d'extraction de lipides par solvants. En comparant différentes méthodes d'extraction, Li *et al.*(2014) ont montré que la méthode d'extraction par le CO₂ supercritique est celle qui a permis d'obtenir les meilleurs rendements.

1.2.2.2 Les protéines

Les protéines constituent la majeure partie de la biomasse microalgale. Elles peuvent être utilisées dans l'alimentation humaine et animale ou comme agent surfactants et gélifiants (Suarez Garcia *et al.*, 2018). L'alimentation animale peut être équilibrée à faible coûts en choisissant des espèces de microalgues contenant les ratios d'acides aminés essentiels requis (Vanthoor-Koopmans *et al.*, 2013). La séparation des protéines se fait généralement par précipitation et/ou filtration de broyat de microalgues. La précipitation consiste à varier le pH pour induire une précipitation sélective et maximale des protéines au point isoélectrique. Les méthodes de filtration mettent à profit les différences de polarité et de taille moléculaire pour la récupération sélective des protéines. Des procédés plus complexes permettent d'avoir des puretés plus élevées (extraction + filtration + dialyse ou précipitation+ dialyse + adsorption) (Suarez Garcia *et al.*, 2018). Les protéines peuvent également être solubilisées à l'aide de surfactants dans des solvants organiques tout en préservant leur fonctionnalité. Des essais d'extraction de protéines avec du CO₂ supercritique ont également été expérimentés par Chew *et al.*(2017). Les procédés membranaires (ultrafiltration et diafiltration) ont l'avantage de ne pas utiliser d'additifs facilitant ainsi la purification des protéines. Ce sont également des méthodes douces déjà utilisées dans l'industrie laitière et qui préservent la fonctionnalité des protéines pour des applications alimentaires (Safi *et al.*, 2017b; Suarez Garcia *et al.*, 2018).

1.2.2.3 Les glucides

Les microalgues contiennent une fraction glucidique composée essentiellement de glucose, d'amidon, de cellulose et de polysaccharides. Le glucose et l'amidon peuvent être utilisés pour la production de bioéthanol et d'hydrogène tandis que les polysaccharides trouvent des applications comme ingrédients alimentaires et additifs cosmétiques ou agents thérapeutiques naturels pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Par exemple les microalgues des genres *Porphyidium* et *Rhodella* secrètent des exo-polysaccharides utilisés comme polysaccharides sulfatés dans l'industrie cosmétique (Gaignard *et al.*, 2018).

1.2.2.4 Les pigments

On peut regrouper les pigments en trois catégories : les caroténoïdes, les chlorophylles et les phycobiliprotéines. Les pigments peuvent être utilisés comme précurseurs de vitamines dans l'alimentation humaine et animale, comme colorants alimentaires, additifs en cosmétiques et pour des biomatériaux.

Les caroténoïdes sont des pigments liposolubles qui sont extraits généralement à l'aide de solvants organiques ou de fluides supercritiques. Pour améliorer les rendements d'extraction, la biomasse peut être prétraitée par des méthodes de destruction cellulaire. L'astaxanthine est un exemple de caroténoïde précurseur de la vitamine A possédant des propriétés antioxydantes exceptionnelles, anti-vieillissantes, de protection solaire, anti-inflammatoires et de stimulation du système immunitaire. Elle est très sensible à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène et se dégrade facilement. La microalgue *Haematococcus pluvialis* est connue comme une source privilégiée (1-3 % de la matière sèche) d'astaxanthine (Chew *et al.*, 2017; Khanra *et al.*, 2018). Le β -carotène est souvent extrait de la microalgue *Dunaliella salina* (jusqu'à 10 % de la matière sèche). Il est commercialisé principalement aux Etats Unis, en Australie en Inde, Israël et en Chine. Le marché des caroténoïdes était estimé à 1,5.10⁹ \$ en 2014 avec une croissance prévue jusqu'à 1,8.10⁹ \$ en 2019 (Khanra *et al.*, 2018).

Les chlorophylles sont des pigments liposolubles extraits majoritairement par les solvants organiques tels que le méthanol et l'éthanol qui permettent d'avoir de meilleurs rendements qu'avec l'acétone. La microalgue du genre *Chlorella. sp* sont connues comme «l'aliment vert» à cause de leur haute teneur en chlorophylle (Khanra *et al.*, 2018).

Les phycobiliprotéines sont des pigments hydrosolubles qui possèdent des propriétés colorantes alimentaires, antioxydantes, antivirales, anti cancer, anti-allergie anti-inflammatoires, et neuroprotectrices. On peut citer par exemple, la phycocyanine retrouvée chez la cyanobactérie *A. platensis*. L'extraction et la purification des phycobiliprotéines impliquent généralement de longues étapes. Une méthode récente d'extraction à deux phases aqueuses intégrant la filtration membranaire a permis d'atteindre des indices de pureté de 3,7 et 0,74 respectivement pour la phycocyanine et l'allophycocyanine en une seule étape (Patil *et al.*, 2008).

1.2.2.5 Les vitamines

Les microalgues contiennent des taux importants de vitamines essentielles et biodisponibles comparativement aux aliments usuels. La teneur en vitamine B₁₂ chez les cyanobactéries dépend de la source et la disponibilité de l'azote (Bonnet *et al.*, 2010). La forme bioactive de vitamine B₁₂ pour les humains et les microalgues est la cobalamine et pseudo cobalamine. Certaines microalgues ont la capacité de transformer dans certaines conditions la forme biologiquement inactive de pseudo cobalamine B₁₂ en forme bioactive (Grossman, 2016). La riboflavine est une vitamine dont la carence chez les poissons cause une baisse d'appétit et de croissance, une photophobie, la cataracte, une faible coordination et une anémie. Brown et Farmer (1994) ont suivi la teneur en riboflavine pendant la croissance de six microalgues : elle était maximale en phase de latence.

1.3 Conclusions sur le bioraffinage des microalgues

L'analyse des ressources, l'évaluation technico-économique des procédés et l'analyse de cycle de vie sont des outils qui permettent d'évaluer la durabilité et la faisabilité économique de procédés de bioraffinage de microalgues. Un grand effort reste à fournir pour harmoniser les études et avoir des résultats cohérents et transparents. En effet de grands écarts sont observés sur les estimations à cause de contour du système des hypothèses et des modèles utilisés. Les analyses technico économiques manquent souvent de validation à grande échelle, et d'utilisation de modèles dynamiques de croissance. Plus d'études sur les ressources en eau et en nutriments doivent également être menées (Quinn et Davis 2015).

L'analyse de cycle de vie (ACV) permet de détecter des schémas favorables de bioraffinage. Par exemple, l'extraction des lipides pour remplacer les huiles végétales et l'utilisation du résidu pour l'alimentation animale (Posada *et al.*, 2016). Mais les résultats de l'ACV sont difficilement comparables étant donné la non maturité des procédés de bioraffinage et la diversité des options. Une ACV des produits doit être automatiquement être faite pour chaque cas d'application (Quinn et Davis 2015).

Des améliorations technologiques sont nécessaires notamment dans le DSP des bioraffineries de microalgues dont les coûts (50-60 % des coûts totaux) restent élevés par rapport aux autres domaines des biotechnologies (20-40 %). La multitude des opérations de purification et la complexité des procédés notamment pour la production de spécialités tels que les pigments en sont la principale cause. Deux alternatives ont été proposées par 't Lam *et al.*(2018) : la réduction des opérations par l'intégration de plusieurs opérations et la suppression des produits auxiliaires (solvants, flocculant,...) afin d'éliminer les coûts de récupération et de limiter les résidus dans les produits. On peut citer comme exemple

d'intégration, la combinaison de la récolte et de la destruction cellulaire en utilisant des flocculants alternatifs : les surfactants cationiques ou les biopolymères nano composites qui affaiblissent les parois cellulaires (Kim *et al.*, 2015; Seo *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'utilisation de liquides ioniques (Desai *et al.*, 2016) pour perforer les cellules et permettre l'extraction et la séparation entre lipides et protéines dans des systèmes diphasiques aqueux est envisageable. Il faudra alors réaliser des études approfondies pour mieux connaître la structure des parois cellulaires et comprendre les mécanismes d'action des liquides ioniques. Autre exemple, il a été proposé pour casser les émulsions formées par le broyage d'utiliser des méthodes électrostatiques, des champs électriques pulsés, des ultrasons ou des techniques laser (Lam *et al.*, 2018).

En résumé, des améliorations doivent être faites particulièrement dans les deux étapes clés du DSP que sont le broyage cellulaire et l'extraction afin de simplifier les procédés de fractionnement et/ou purification nécessaires par la suite.

2. Les méthodes de destruction cellulaire

2.1 Généralités sur la destruction cellulaire

2.1.1 Importance de la destruction cellulaire

La plupart des microalgues exploitées industriellement possèdent des parois épaisses et rigides qui sont peu ou pas perméabilisées par les solvants (Tableau 2 et Tableau 6). Ces parois ont une composition complexe (structure à 3 couches) avec une grande résistance chimique et mécanique servant de barrière protectrice contre les invasions et conditions extérieures rudes. Les parois des microalgues sont généralement composées d'une large proportion de cellulose leur conférant leur rigidité et leur stabilité chimique. Certaines espèces comme *Nannochloropsis sp* possèdent une couche tri laminaire supplémentaire d'algaenane les rendant extrêmement résistantes. Des liaisons covalentes, hydrogène et/ou des interactions de van der Waals renforcent les molécules de structure des parois (Phong *et al.*, 2018). De plus, la plupart des molécules d'intérêts sont sous forme de globules (lipides) ou grains (amidon) dans le cytoplasme, à l'intérieur des organites (pigments) ou liées aux membranes (lipides, protéines et sucres), Il est donc nécessaire de rompre parois et membranes cellulaires afin de les extraire efficacement (Günerken *et al.*, 2015).

Tableau 6 : Composition générale des parois cellulaires de microalgues couramment utilisées en biotechnologies modifié de (Lee *et al.*, 2017)

Microalgue	Structure et composition de la paroi	Applications et produits
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5 couches distinctes en glycoprotéines riches en hydroxyproline - Couche externe trilaminaire ou microfibrillaire - Pas de cellulose -Assemblé entièrement à partir de glycoprotéines	Organisme modèle pour l'analyse de cycle de vie et la génétique moléculaire
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3 couches pour un cyste mature rouge : - Couche primaire : matrice extracellulaire ; feuille trilaminaire composée d'algaenane - Couche secondaire : épaisse et amorphe composée de mannose et de cellulose - Couche tertiaire : arrangement hétérogène de mannose et de cellulose	Lipides, astaxanthine et alimentation en aquaculture
<i>Chlorella sp</i>	Parois à deux couches pour une cellule mature - Couche externe : structure trilaminaire, dense d'électrons et fine couche d'algaenane - Couche interne : couche de faible densité composée de mannose et de polysaccharides proches de la chitine	Lipides, nutrition humaine, cosmétiques et alimentation en aquaculture
<i>Nannochloropsis sp</i>	Structure à deux couches constituées d'une paroi interne en cellulose protégée par une couche externe d'algaenane hydrophobe - Couche externe : très saturée avec de longues chaînes aliphatiques avec des liaisons éther ponts - Couche interne : feuille trilaminaire de cellulose	Lipides et alimentation en aquaculture

Par ailleurs, la destruction cellulaire permet de rendre la biomasse algale plus digestible (pour la conversion directe de la biomasse ou l'alimentation) avec des plus petits débris et des molécules libres.

⇒ **La destruction cellulaire peut être définie comme étant la perte d'intégrité de la paroi ou de la membrane cellulaire - elle conduit à la libération du contenu intracellulaire.**

Dans ses travaux de thèse Montalescot (2015) a distingué différents niveaux de destruction cellulaire selon le degré de micronisation des débris et la sélectivité de libération des molécules (Figure 8):

- La perméabilisation : elle consiste en une perforation de la membrane et parois cellulaire permettant la libération des molécules intracellulaires.
- La déstructuration : parois et membranes sont rompues et libèrent des organites intacts.

- La désintégration : les parois et membranes des organites sont décomposées et les débris cellulaires sont plus petits.

Plus on avance en niveau de destruction moins on a une libération sélective des molécules car on les libère simultanément.

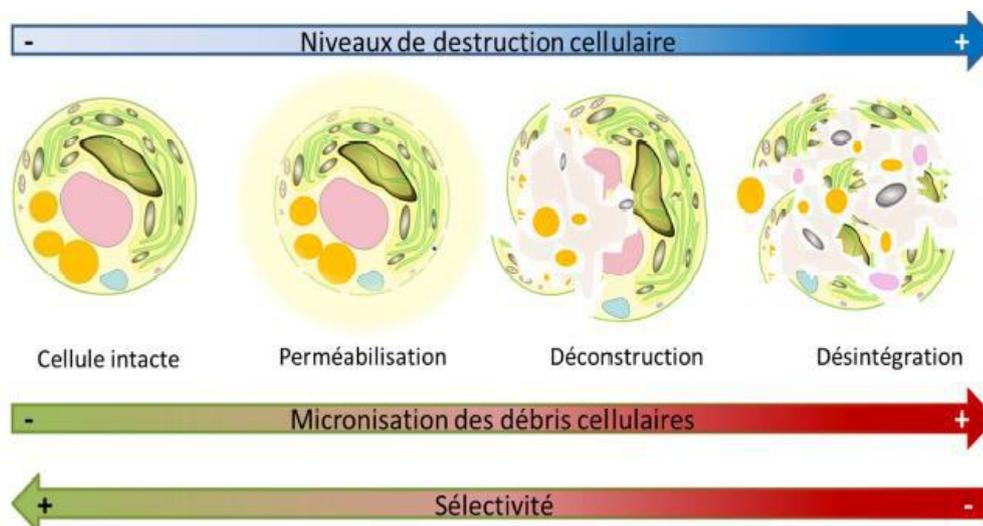


Figure 8 : Niveaux de destruction cellulaire (Montalescot, 2015)

La destruction cellulaire est une étape cruciale : elle détermine les coûts totaux de production ainsi que la quantité et la qualité de métabolites intracellulaires rendus extractibles (Phong *et al.*, 2018).

2.1.2 Mesure de la destruction cellulaire

L'efficacité de destruction cellulaire est mesurée soit par des méthodes directes basées sur le comptage des cellules intactes, soit par des méthodes indirectes basées sur le dosage de molécules libérées (Middelberg, 1995).

Parmi les méthodes directes, la méthode la plus classique est le comptage manuel ou automatique par microscopie optique sur des hématimètres (cellules de Malassez, Neubauer, Nageotte). Le taux de destruction peut être exprimé en nombre ou en volume. Pour mieux identifier les cellules dont les parois et membranes ne sont plus intactes on peut utiliser une coloration préalable au bleu de méthylène ou à l'iodure de propidium. L'analyse de la taille des particules peut également être utilisée pour une mesure qualitative de la destruction cellulaire (granulométrie laser...).

Parmi les méthodes indirectes on peut par exemple mesurer le taux de libération des protéines solubles (Middelberg, 1995; Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2015) sous forme de facteur d'extraction :

$$FE = \frac{C - C_0}{C_{max} - C_0} \quad (1)$$

C : la concentration de protéines solubles dans le surnageant du broyat (après centrifugation poussée)

C_0 : la concentration de protéines dans le milieu de culture avant destruction qui pour la majorité des cas est négligeable (sauf culture déliquescence)

C_{max} : la concentration maximale possible de protéines correspondant à une destruction complète.

Des erreurs liées aux dilutions et à la dégradation des molécules limitent la précision des méthodes indirectes (Spiden *et al.*, 2013). Par exemple pour des échantillons partiellement dégradés, la dilution modifierait la solubilité des protéines causant des erreurs d'estimation de la destruction à des niveaux de destruction élevés pour les analyses de protéines basées sur la spectrométrie (BCA et Lowry) (Middelberg, 1995). A des niveaux de destruction élevés la libération simultanée d'enzymes (protéases, lipases) induit une dégradation rapide des molécules causant la sous-estimation de la destruction (Günerken *et al.*, 2017). De plus, ces méthodes colorimétriques peuvent être perturbées par la présence de lipides, sucres et dépendent de la protéine standard utilisée. Selon Laurens *et al.*(2012), la méthode d'estimation basée sur la mesure de l'azote total et le choix d'un facteur de conversion d'azote en protéines selon les conditions de cultures des microalgues donnerait des résultats plus précis et proches de la composition réelle en protéines. Par ailleurs, Günerken *et al.* (2017) ont proposé une méthode d'estimation de la destruction cellulaire par cytométrie en flux. Sa méthode consistait à utiliser les données de diffusion frontale (permettant d'accéder à la taille des particules) couplées à un signal lié à la fluorescence de la chlorophylle. En corrélant les résultats de cytométrie avec le taux de libération de biomasse (exprimée en MS : $1 - \frac{MS(culot)}{MS(biomasse)}$), ils ont conclu que cette méthode était plus précise que le comptage par microscopie. Cependant leur méthode nécessite des moyens plus complexes pour sa mise en œuvre (cytométrie en flux), et pourrait être sujette à des erreurs liées d'une part à la diffusion des débris cellulaires et d'autre part au critère de destruction de référence (libération de biomasse en MS) qui est moins approprié qu'un comptage avec marquage de cellules intactes.

Il est difficile de parler d'une méthode idéale d'évaluation de destruction de microalgues. La preuve est la diversité des méthodes utilisées dans la littérature. Selon l'application voulue, chaque méthode apporte ses avantages : les méthodes directes, plus précises sont indispensables pour la modélisation de la destruction cellulaire, tandis que les méthodes indirectes rapides sont utiles pour quantifier directement les molécules libérées pour des études appliquées au bioraffinage (Middelberg, 1995).

A côté du degré de destruction, la qualité des produits libérés peut également être un critère important à vérifier dans la perspective du bioraffinage. Par exemple la fonctionnalité

(surfactants, gélifiants) des protéines, l'activité d'enzymes, l'oxydation ou l'hydrolyse de lipides peuvent être mesurées afin de choisir une méthode de destruction.

2.1.3 Critères de choix des méthodes de destruction pour le bioraffinage

⇒ **Le choix des méthodes de destruction cellulaire se base généralement sur l'efficacité de destruction, l'universalité de la méthode (adaptée à tous types de microalgues), la possibilité d'extrapolation et des coûts de mise en œuvre et d'investissement de la méthode.**

Pour le cas particulier du bioraffinage de microalgues, la **douceur** de la méthode est un critère important. En effet, la méthode doit permettre de conserver les fonctionnalités du produit principal visé et des coproduits valorisables (Postma *et al.*, 2015). Par ailleurs, il est souhaitable d'avoir une méthode qui permet une libération **sélective** des différentes fractions afin de faciliter les étapes d'extraction et de purification. Par exemple, si les protéines sont le produit principal visé, la destruction doit permettre de manière séquentielle la récupération des protéines et celle des autres produits issus de la biomasse.

Il existe une large diversité de méthodes de destruction cellulaires. Elles peuvent être regroupées selon les mécanismes en 2 groupes : les méthodes chimiques et enzymatiques, et les méthodes physiques. Les méthodes peuvent également être couplées.

2.2 Méthodes chimiques et enzymatiques

Les méthodes de destructions chimiques et enzymatiques sont des méthodes spécifiques basées sur les interactions des produits chimiques ou enzymes avec les composants structurels des parois et membranes cellulaires. Elles consistent à détruire les liaisons dans la structure des membranes et parois pour entraîner la lyse cellulaire.

2.2.1 Méthodes chimiques

De nombreux composés chimiques peuvent causer la lyse cellulaire : les antibiotiques, les agents chélatants (Exemple : EDTA), les chaotropes, les détergents, les solvants, les hypochlorites, les acides et les bases. Différents mécanismes d'actions sont impliqués : les antibiotiques empêchent la synthèse des constituants des parois, les agents chélatants forment des liaisons avec les cations (Mg, et Ca) des membranes et créent des ponts entre les molécules des parois et les chaotropes (Exemples : urée, guanidine) désorganisent la structure de l'eau rendant le milieu moins hydrophile solubilisant ainsi les composés hydrophobes des parois. Les détergents (par exemple le SDS) forment des micelles avec les lipides et protéines des membranes et les solvants dissolvent les molécules hydrophobes et perforent les membranes et parois cellulaires. Les bases saponifient les lipides membranaires et les acides perforent les membranes et les parois (Middelberg, 1995; Günerken *et al.*, 2015). L'utilisation de solvants dans le bioraffinage des microalgues a généralement pour objectif l'extraction des molécules

(lipides, pigments), les résultats de destruction cellulaire ne sont pas systématiquement analysés. Les traitements acides et alcalins se font généralement à haute température (>100°C). La réduction des températures nécessite la combinaison avec d'autres méthodes de destruction pour avoir une efficacité suffisante. De plus, ces méthodes peuvent dénaturer les composés sensibles : les bases dénaturent les protéines et les acides dégradent les pigments (Günerken *et al.*, 2015). A côté de ces méthodes on peut citer l'utilisation de liquides ioniques, les chocs osmotiques.

2.2.2 Méthodes enzymatiques

Les méthodes enzymatiques sont des méthodes spécifiques, qui permettent des conditions douces, de faibles consommations d'énergie, de faibles coûts d'investissement et sont faciles à extrapoler. Les principales enzymes utilisées sont les glycosidases, les glucanases, les peptidases et les lipases. Les enzymes forment des liaisons spécifiques avec les molécules contenues dans les parois et membranes cellulaires entraînant ainsi leur dégradation. Le principal paramètre de cette méthode est la nature de l'enzyme qui détermine également les coûts opératoires (Günerken *et al.*, 2015). Il est parfois nécessaire d'utiliser un cocktail d'enzymes pour vaincre les parois très rigides. Wu *et al.* (2017) ont utilisé un mélange de cellulase, protéase, lysozyme et de pectinase avec un prétraitement alcalin pour obtenir 90% d'extraction de lipides de *Nannochloropsis sp.* Même si la destruction par les procédés enzymatiques est prometteuse en terme de consommation d'énergie, les inconvénients sont les longs temps de traitement, les coûts élevés des enzymes pour une production de masse, la difficulté de leur conservation et réutilisation (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). L'immobilisation des enzymes est une alternative explorée (Fu *et al.*, 2010) pour permettre la réutilisation des enzymes. La combinaison des méthodes enzymatiques avec des méthodes mécaniques ou chimiques pourrait permettre de réduire les coûts (Phong *et al.*, 2017b).

Les enzymes peuvent être produites par des organismes mis en coculture avec les algues (cyanobactéries, virus, bactéries, ou microalgues). Cette approche algicide peut être une alternative peu coûteuse à l'achat d'enzyme mais nécessite une maîtrise de l'effet de ces microorganismes sur la croissance des microalgues (Lee *et al.*, 2017).

2.3 Méthodes physiques

Les méthodes de destructions physiques regroupent toutes les méthodes basées sur des champs électriques, magnétiques, des ondes ou des contraintes mécaniques.

2.3.1 Méthodes basées sur les ondes

2.3.1.1 Les champs électriques pulsés (CEP)

Lorsque les cellules sont soumises à des champs électriques suffisamment puissants avec des pulsations rapides l'eau pénètre dans les couches de lipides bipolaires des membranes. Cela

entraîne une réorientation des faces polaires vers l'eau et la formation de pores (Kotnik *et al.*, 2015). Plusieurs études ont montré que l'utilisation de champs électriques pulsés améliore l'extraction de molécules de microalgues : protéines de *C. vulgaris*, de *H. pluvialis* (Coustets *et al.*, 2015) et de *Nannochloropsis sp* (Parniakov *et al.*, 2015); lutéine de *C. vulgaris* (Luengo *et al.*, 2015) ; C-phycocyanine de *A. platensis* (Martínez *et al.*, 2017). Les paramètres importants sont la puissance des champs ($10\text{-}50 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$), la fréquence (quelques Hz), la durée des pulsations (μs - ms) et la durée totale du traitement. C'est une méthode simple et douce: Goettel *et al.* (2013) ont observé une élévation de température modérée de 38°C sans régulation thermique en traitant des suspensions de *Auxenochlorella protothecoides*. Postma *et al.*(2016) ont montré que l'activité de la protéine Rubisco était conservée avec les CEP. Cette méthode attire de plus en plus l'attention des industriels et des équipements de grandes échelles sont développés (Exemple : brevet OriginOil Figure 9). Même si les plages de consommation spécifique d'énergie reportées sont larges ($0,15\text{-}239 \text{ kWh}\cdot\text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$) (Lam *et al.* 2017), une consommation du même ordre de grandeur que les méthodes mécaniques ($0,3 \text{ kWh}\cdot\text{kg}_{\text{MS}}^{-1}$) a été obtenue par Goettel *et al.* (2013) en augmentant la concentration des suspensions. Cependant, selon les travaux de Lam *et al.*(2017), Goettel *et al.*(2013) et Carullo *et al.*(2018), l'utilisation unique des champs électriques pulsés a permis une libération importante d'ions (75 %) et de sucres (39 %) sans libération quantitative des protéines ($\sim 5 \%$). L'action des champs électriques pulsés a donc été suggérée comme une étape préliminaire pour l'extraction de petites molécules solubles avant la libération et/ou l'extraction de plus grosses molécules (protéines, lipides) par des solvants ou méthodes mécaniques (Goettel *et al.*, 2013; Postma *et al.*, 2016; Lam *et al.*, 2017; Carullo *et al.*, 2018).

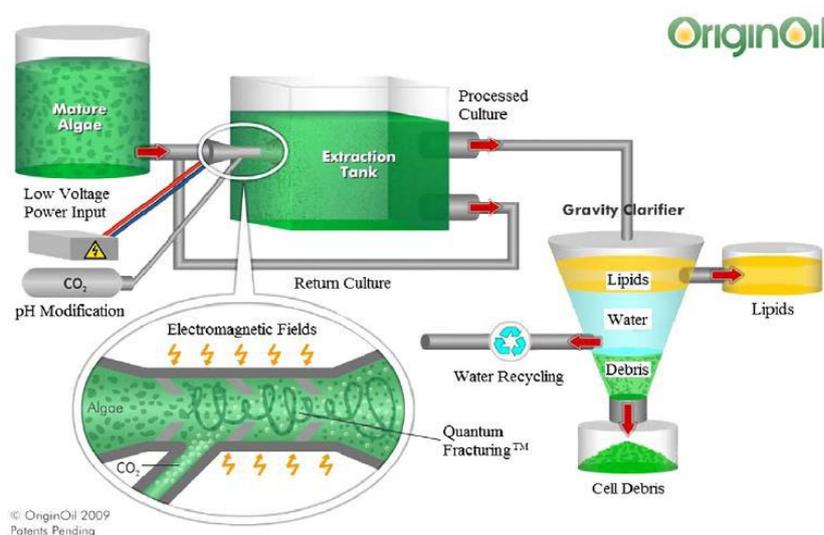


Figure 9 : Exemple de procédé intégré de concentration, destruction cellulaire et d'extraction de lipides (OriginOil, 2010)

2.3.1.2 Les ultrasons (US)

L'utilisation des ultrasons soumet les microalgues à l'implosion de bulles instables formées dans le milieu liquide, qui génèrent des ondes de choc et une dissipation d'énergie mécanique et chimique conduisant à la rupture de leurs parois rigides. C'est une méthode de destruction douce utilisée généralement comme prétraitement pour améliorer l'extraction de molécules. En effet, l'extraction par l'éthanol de phycocyanine d'une biomasse d'*A. platensis* assistée par ultrasons a permis de réduire de 4 fois le temps d'extraction par rapport à la méthode Soxhlet à 50°C avec un rendement de 15,66 % contre 11,13 % (Hadiyanto *et al.*, 2016). Aussi, l'extraction de lipides sur des chlorophycées cultivées sur des eaux usées a été améliorée d'un facteur 2 (Keris-Sen *et al.*, 2014). Gerde *et al.* (2012) ont également amélioré l'extraction de lipides provenant de *C. reinhardtii* et *S. limacinum* mais ont constaté la formation de radicaux libres et la dégradation de l'acide arachidonique lorsque l'intensité des ondes était élevée. Les fréquences d'ondes utilisées dans les références mentionnées sont de l'ordre de 20-40 kHz à une puissance de l'ordre de 100 W avec des ondes non focalisées. L'utilisation d'ultrasons focalisés de haute intensité (3,2 MHz à 40 W) a apporté une meilleure efficacité énergétique pour l'extraction de lipides de *N. oculata* et *S. dimorphus* (Phong *et al.*, 2017b; Wang *et al.*, 2014). Un exemple prometteur de procédé intégré de destruction extractive a permis de récupérer 84,2 % des protéines de *C. sorokiniana* avec un système aqueux à deux phases (30 % en masse de K_3PO_4 ; 20 % de méthanol et 3 % de NaCl) assisté par ultrasons. La méthode utilisée était simple, rapide, extrapolable (100×) et a permis de recycler le méthanol pour 5 cycles (Phong *et al.*, 2017a).

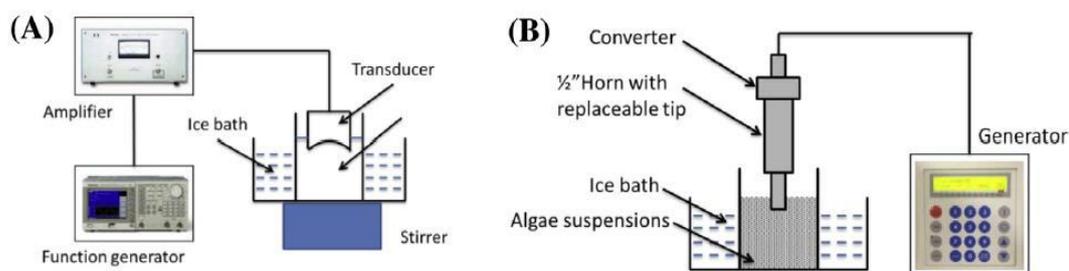


Figure 10 : Schéma de systèmes de destruction cellulaire par ultrasons : (A) Ultrasons focalisés de haute intensité; (B) ultrasons de basse fréquence non focalisés (Wang *et al.*, 2014)

2.3.1.3 Les microondes

Lorsque les suspensions de microalgues sont soumises à des microondes d'environ 2,5 GHz, ces dernières interagissent avec les molécules polaires ou diélectriques telles que l'eau et créent une hausse locale de température. L'eau contenue dans les cellules se vaporise alors et augmente la pression intracellulaire provoquant la rupture des parois et membranes cellulaires. L'effet couplé de la chaleur et de la formation des pores dans les membranes facilite l'extraction de molécules intracellulaires (Günerken *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012). Afin de distinguer l'effet de

l'augmentation de température inhérente aux microondes de l'effet réel des microondes, les rendements d'extraction sont généralement comparés à ceux d'un traitement thermique à la même température. L'utilisation des microondes est efficace pour la destruction cellulaire : McMillan *et al.*(2013) ont détruit 94,9 % de la microalgue robuste *N. oculata*. Cependant, la méthode implique des températures élevées (au-delà de 90°C) pouvant dégrader des molécules sensibles telles que les protéines et les pigments. Elle a le plus souvent été utilisée pour améliorer l'extraction de lipides par solvant. Comparativement à une extraction Soxhlet, Balasubramanian *et al.*(2011) ont observé un degré d'insaturation des acides gras plus important par extraction assistée par microondes pour *S. obliquus*. Ils en ont déduit que la méthode était à la fois compatible à la production de biodiesel et d'huile alimentaire. De plus, par rapports aux techniques comme l'autoclavage, la sonication et l'agitation avec des billes, les microondes ont été considérées comme étant la plus simple et efficace pour l'extraction d'huile des microalgues *Botryococcus sp*, *C. vulgaris* et *Scenedesmus sp* (Lee *et al.*, 2010).

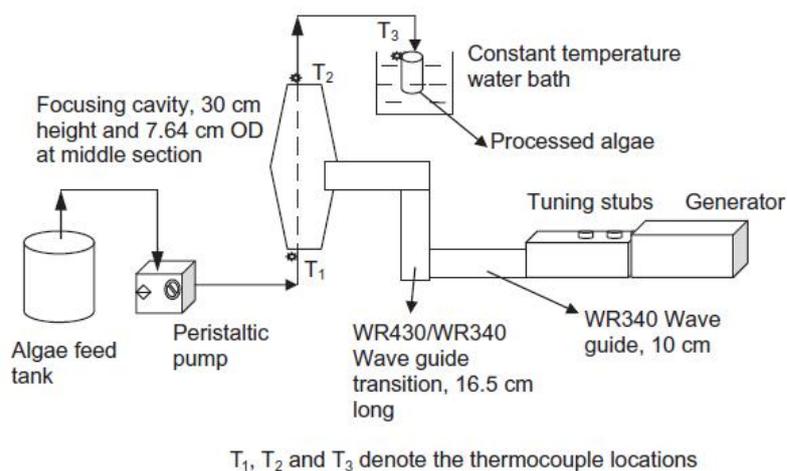


Figure 11 : Schéma d'un système continu de destruction cellulaire par microondes (Balasubramanian *et al.*, 2011)

2.3.2 Méthodes mécaniques

2.3.2.1 La cavitation hydrodynamique (CH) :

La cavitation est un mécanisme qui se retrouve dans plusieurs technologies de destruction cellulaire. La cavitation hydrodynamique est induite lorsque la vitesse du fluide augmente fortement lors du passage par un orifice ou une forte réduction de section. La chute de pression peut atteindre la tension de vapeur du liquide provoquant la formation de fines bulles qui implosent lorsque la pression augmente à nouveau (Figure 12) (Lee *et al.*, 2012). La pression lors de l'implosion des bulles dépend entre autres de la vitesse du fluide, de sa viscosité et de sa pression de vapeur, de la géométrie des orifices et de la présence de gaz dissouts (Lee *et al.*, 2015). L'utilisation de la cavitation hydrodynamique a été jugée sélective pour la destruction car entraînait uniquement la rupture de la paroi périplasmique des levures *Saccharomyces*

cerevisiae contrairement au broyage haute pression et au broyage à billes. De plus, l'énergie spécifique consommée, de l'ordre de $33 \text{ MJ.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ était relativement faible (Balasundaram and Pandit, 2001). Une destruction localisée (périplasmique en laissant les cellules entières) par cavitation hydrodynamique de *T. suecica* a également été constatée avec une plus faible consommation énergétique $3 \text{ MJ.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (Lee *et al.*, 2015). Cependant, la cavitation hydrodynamique semble être limitée pour la destruction de microalgues rigides telles que *N. salina*, elle a donc été utilisée pour détruire sélectivement des contaminants (rotifères) des bassins de culture ouverts (Kim *et al.*, 2017).

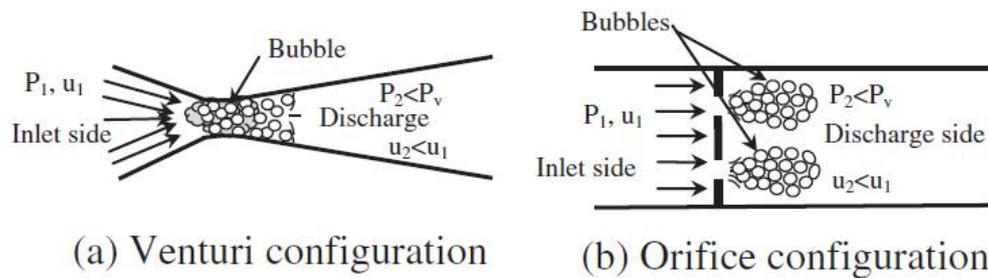


Figure 12 :Exemples de dispositifs induisant la cavitation hydrodynamique (Yusaf and Al-Juboori, 2014)

2.3.2.2 Broyage à haute vitesse (BHV)

Il s'agit d'équipements composés d'un stator et d'un rotor de géométries variées (fentes, dents, ...) (Figure 13) mis en œuvre à des vitesses très élevées (10000-14000 rpm). Les forces de cisaillement à l'interface solide/liquide et la cavitation hydrodynamique créée par des chutes locales de pression près de l'agitateur sont responsables de la destruction cellulaire (Gogate and Pandit, 2008; Günerken *et al.*, 2015). La méthode est encore peu utilisée pour les microalgues et est souvent couplée avec l'extraction de lipides par solvant (Khoo *et al.*, 2011; Balasubramanian *et al.*, 2013).

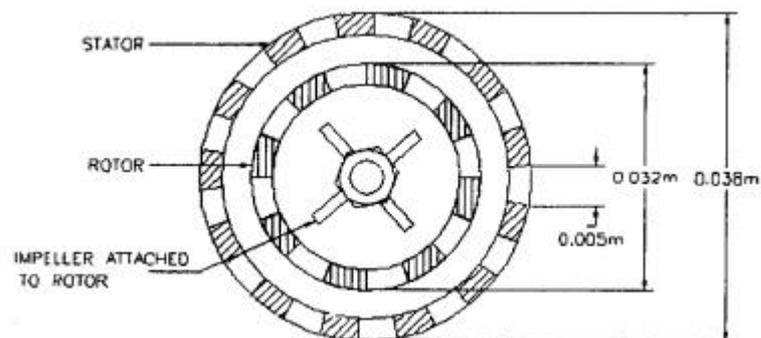


Figure 13 : Exemple d'agencement d'un broyeur à haute vitesse (Kumar and Pandit, 1999)

2.3.2.3 Broyage haute pression (BHP)

Le fonctionnement du BHP consiste à pomper la suspension à haute pression, puis à la forcer à passer dans un petit orifice d'une valve. Le jet de suspension accéléré à la sortie de l'orifice impacte la partie stationnaire de la valve avant d'être récupéré dans une chambre à basse pression. La rupture cellulaire résulte des contraintes de cisaillement, des turbulences et de la cavitation au passage à basse pression (Halim *et al.*, 2012) (Figure 14). Le BHP est une méthode de destruction simple à mettre en œuvre, extrapolable et permet une destruction complète pour la plupart des microalgues.

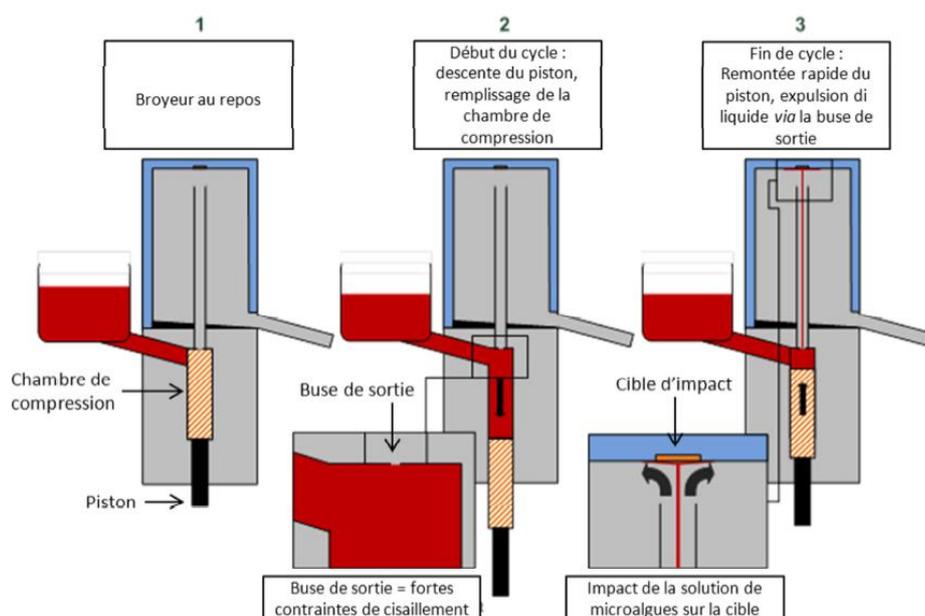


Figure 14 : Principe de fonctionnement du broyage haute pression (Jubeau, 2012)

Le Tableau 7 compile les résultats d'études sur le broyage haute pression de microalgues. Les études du BHP sont consacrées principalement aux effets de la pression de travail (100-40000bar) qui détermine la consommation d'énergie, du nombre de cycles et de la matière sèche des suspensions (Tableau 7). Cependant, cette méthode est très énergivore et conduit à la formation de débris fins causant des difficultés dans l'étape de fractionnement (Carullo *et al.*, 2018). Une piste pour la réduction de la consommation énergétique est de traiter des suspensions concentrées. La limite en concentration est fonction de la viscosité de la suspension et de la technique de pompage. De plus, Yap *et al.* (2015) et Xie *et al.* (2016) n'ont pas constaté d'effet de la concentration des suspensions sur l'efficacité du broyage haute pression respectivement entre 2-10 g.l⁻¹ et 0,25-25 % en MS, tandis que Halim *et al.* (2012) ont constaté une meilleure efficacité avec les suspensions plus diluées.

Tableau 7 : Compilation d'études de broyage haute pression de microalgues : P : pression de travail ; n : nombre de cycles de broyage ; MS : matière sèche des suspensions ; η : taux de destruction ; t : durée du traitement ; P_{50} : pression pour 50% de destruction ; E_s : Energie spécifique consommée

Microalgues	Etude	Résultats	Références
<i>Desmodesmus sp F51</i>	Effet P Effet MS (2-10g.l ⁻¹) Effet n :1-4	-Pas d'effet de MS -Effet positif de P sur η -Paramètre clé P	(Xie <i>et al.</i> , 2016)
<i>Nannochloropsis sp</i>	Biomasse prétraitée (37°C pendant 5-26h) MS : 20-25% P =1200bar Extraction lipides	-70% lipides totaux et 86% des lipides neutres avec faible ration de solvant à 35°C -Affaiblissement cellules pour $t > 15h$	(Olmstead <i>et al.</i> , 2013)
<i>Nannochloropsis. sp</i> <i>Chlorella. sp</i> , <i>Tetraselmis sp</i>	Effet P	- P_{50} = 170, 1070,1380 et 2000 bar respectivement pour : <i>T. suecica</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Nannochloropsis. sp</i>	(Spiden <i>et al.</i> , 2013)
<i>Chlorella sp</i> , <i>Navicula sp</i>	Prétraitement acide (HCl pH=1,5) et thermique (123°C) P : 390 – 840 bar Extraction lipides	-Rupture des parois mais solidification du protoplaste par les prétraitements -Extraction possible sur les protoplastes solidifiés	(Spiden <i>et al.</i> , 2015)
<i>Chlorococcum sp</i>	P : 50-850bar Effet n Comparaison BB, US, Autoclave	-Effet négatif de concentration cellulaire	(Halim <i>et al.</i> , 2012)
<i>C. vulgaris</i>	P : 1500 bar n : 1-10 cycles Comparaison CEP Libération protéines et sucres	Destruction complète -53 % de protéines libérées -40 % des sucres	(Carullo <i>et al.</i> , 2018)
<i>Nannochloropsis sp</i>	MS (0,2 5%-25 %) P : 300-1500 bar	-Pas d'effet MS jusqu'à 25 % sur efficacité	(Yap <i>et al.</i> , 2015)
<i>N. gaditana</i>	Q : 9 l.h ⁻¹ MS : 100 g.l ⁻¹ Libération protéines	- $\eta > 95$ % -Possibilité $E_s \sim 0,5$ kWh.kg ⁻¹ - $E_{s,protéine}$ (kWh/kg de protéine extraite) au BHP < BB	(Safiet <i>al.</i> , 2017a)

2.3.2.4 Le broyage à billes (BB)

Les broyeurs à billes agitées sont utilisés pour la dispersion, la désagglomération et le broyage de particules dans les industries chimiques, céramiques, pharmaceutiques, encres, alimentaire, plastique, papier, bio ingénierie, nanotechnologies et cosmétiques (Kwade and Schwedes, 2007).

Les premiers prototypes de broyeurs étaient des broyeurs à boulets rotatifs et les broyeurs à boulets vibrants utilisés pour le broyage humide ultrafin. Ces derniers étant limités par les vitesses de rotation des chambres et la consommation énergétique, le principe des billes (6-8 mm) a été introduits avec les broyeurs dénommés « attritors » (chambre verticale chargée de

billes sphériques agitées lentement ($\sim 4 \text{ m.s}^{-1}$) en 1928. Des améliorations (augmentation de la vitesse à $8\text{-}20 \text{ m.s}^{-1}$; utilisation de disques) ont été faites par la société Dupont avec le broyeur à sable « Sandmills ». Actuellement, les broyeurs à billes ont des chambres de broyage fermées (pour éviter la formation de bulles de gaz), verticales ou horizontales qui peuvent être munies d'une double enveloppe pour le refroidissement. Les billes sont maintenues dans le broyeur par une fente, un tamis ou un système de centrifugation (Kwade and Schwedes, 2007) (Figure 15).

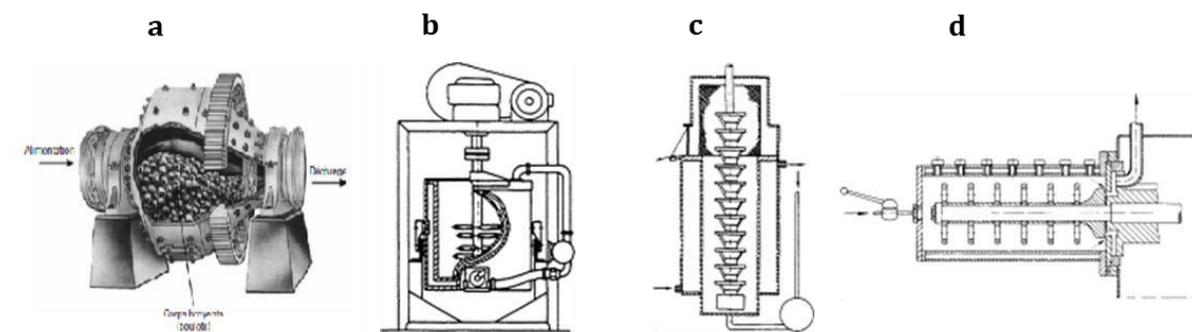


Figure 15 : Développement des broyeurs agités ; **a** : broyeurs à boulets ; **b** : attriteurs (1928) ; **c** broyeurs à sables « Sand Mills » (1950) ; **d** broyeurs à disques d'agitation (Kwade and Schwedes, 2007)

Selon la géométrie de la chambre et de l'agitateur, on distingue plusieurs types de broyeurs à billes agitées. Trois exemples de géométries sont présentés en Figure 16 : les broyeurs avec agitateur à disques ; les broyeurs avec agitateur doigts/ contre doigts et les broyeurs à chambre annulaire

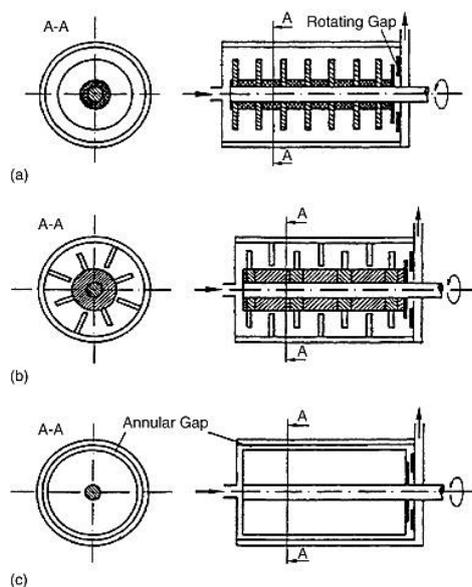


Figure 16 : Différentes géométries de broyeurs à billes (a) broyeurs à disques d'agitation ; (b) broyeurs à doigts-contre doigts ; broyeur à gap annulaire (Kwade and Schwedes, 2007)

Le broyage à billes n'a que récemment été introduit pour le broyage de microorganismes. Le procédé implique l'intervention d'une multitude de paramètres (taille et densité de billes, taux

de remplissage, vitesse d'agitation, temps de broyage, formulation des suspensions...) offrant de larges possibilités de réglage et d'optimisation. Il a l'avantage de permettre d'avoir une grande efficacité de destruction pour une large diversité de microorganismes allant des levures aux bactéries (Currie *et al.*, 1972; Rehacek and Schaefer, 1977; Woodrow and Quirk, 1982; Schütte *et al.*, 1983; Chisti and Moo-Young, 1986; Van Gaver and Huyghebaert, 1991; Heim *et al.*, 2007; Mayerhoff *et al.*, 2008; Haque *et al.*, 2016) ou encore aux microalgues (Tableau 8).

Tableau 8 : Synthèse d'études sur le broyage à billes de microalgues. d_B diamètre des billes ; MS matière sèche des suspensions ; Q débit d'alimentation du broyeur, t durée du traitement en batch ; φ taux de remplissage en bille de la chambre de broyage ; v vitesse d'agitation ; n nombre de passage dans le broyeur ; K , K_p et $K_{pigments}$ constantes cinétiques respectives de destruction et de libération des protéines et des pigments ; E_s énergie consommée par unité de masse de produit.

Paramètres étudiés	Microalgues	Analyse résultats	Résultats	Référence
MS (69,4-158 g.l ⁻¹) $\varphi=60-85$ % v/v d_B : 0,3-0,75 mm verre et 0,3-0,8 mm et zirconium v : 10-16 m.s ⁻¹ Q : 3-1220 kg.h ⁻¹ n Géométrie : disques, doigts, conique Réduction bactéries	<i>Chlorella sp</i>	Comptage cellulaire	- $\eta > 90$ % - Effet + ou - de MS sur η selon la géométrie - Effet + de φ sur η - d_B optimum selon géométrie 0,3-0,5 mm (disques et doigts) et 0,5-0,7 mm (conique) - Effet + de n sur η - Effet - de Q sur η - Nombre de bactéries divisé par 2	(Doucha and Lívanský, 2008)
$d_B=0,4-0,6$ mm zirconium $\varphi=65$ % (v/v) $Q = 1,5$ l.min ⁻¹ $t = 30$ min, recirculation	<i>Tetraselmis sp</i>	Isolation de protéines	-21 % des protéines solubilisées -Isolat contenant 64 % en masse de protéines -Solubilité totale à pH>5,5	(Schwenzfeier <i>et al.</i> , 2011)
Modèle DTS d_B (0,2-2,15mm) Q (48-200 ml.min ⁻¹) v (8-14 m.s ⁻¹) $\varphi=35-85$ % (v/v) Optimisation par Modèle de Stress	<i>P. cruentum</i> <i>N. oculata</i>	Comptage cellulaire	-2-RPA pour la DTS -Résistance (<i>N. oculata</i>) > <i>P. cruentum</i> - d_B opt 1,3 mm pour <i>P. cruentum</i> -meilleur $d_B \sim 0,325$ mm -Mise en évidence SE optimal pour <i>N. oculata</i> et <i>P. cruentum</i>	(Montalescot <i>et al.</i> , 2015)
$d_B=1$ mm zirconium $\varphi = 65$ % (v/v) MS (25-145 g.kg ⁻¹) v (6-12 m.s ⁻¹) K , K_p et $K_{pigments}$	<i>C. vulgaris</i>	-Protéines -Pigments - Destruction (auto fluorescence de chlorophylle) - Viscosité	Cinétique de 1 ^{er} ordre 97 % de destruction v optimale (9-10 m.s ⁻¹) Libération sélective : $K_p > K > K_{pigments}$ Réduction E_s 0,81	(Postma <i>et al.</i> , 2015)

E_s			$\text{kWh.kg}_{\text{MS}}^{-1}$ (145 g.kg^{-1} ; 6 m.s^{-1})	
MS : 10-70 kg.m^{-3} d_B : 0,4-1 mm zirconium φ : 54 % v/v t : 2-8 min v : 4500 tr.min^{-1}	<i>Schizochytrium. sp</i>	-Libération lipides - Observations microscopiques	- MS opt: 50 kg.m^{-3} - $d_{B\text{opt}}$: 0,4-0,6 mm - t opt : 4 min - 40-49 % rendement de lipides - E_s conditions opt : 73,3 $\text{kWh.kg}_{\text{MS}}^{-1}$	(Byreddy <i>et al.</i> , 2016)
d_B : 0,4-1 mm Concentration %v/v t : 10-90 min v : 0,6-7,2 m.s^{-1} Modélisation bilan de population	<i>Nannochloropsis. sp</i>	- Comptage cellulaire - Analyse d'image pour distribution de taille	- η >98 % - d_B : 0,3-4 mm -Concentration 15 % v/v - t opt : 40 min -Effet + de v -Mécanismes impact et compression pour les plus grosses cellules et cisaillement pour les petites	(Pan <i>et al.</i> , 2017)
d_B E_s	<i>C. vulgaris</i> <i>T. suecica</i> <i>N. oleoabundans</i>	-Libération sucres et protéines - Destruction par fluorescence et granulométrie (Cytométrie en flux)	- d_B optimal ~0,4 mm <i>Chlorella</i> - Pas d'effet d_B pour <i>N. oleoabundans</i> et <i>T. suecica</i> - Classification par robustesse croissante : <i>T. suecica</i> , <i>C. vulgaris</i> et <i>N. oleoabundans</i> - meilleure utilisation de l'énergie avec petits d_B	(Postma <i>et al.</i> , 2017)
MS : 100 g.l^{-1} Billes : 0,4 zirconium φ : 65 % v/v v : 2039 tr.min^{-1}	<i>T. suecica</i>	-Diffusion frontale des particules	-Libération de 95 % des protéines solubles en ~8 min	(Suarez Garcia <i>et al.</i> , 2018)

Seulement une dizaine de travaux scientifiques rapportent les résultats de destruction cellulaire de microalgues par broyage à billes. La plupart de ces travaux ont été consacrés à des études empiriques des principaux paramètres du broyage à billes : la taille et la densité des billes, le taux de remplissage, la concentration en MS des suspensions, la vitesse d'agitation, la durée de traitement et/ou les débits d'alimentation. Les méthodes d'évaluation de l'efficacité du broyage sont diversifiées : comptage cellulaire, analyse de protéines, pigments ou sucres, analyse de taille, fluorescence couplée à la granulométrie. Cela rend la comparaison des résultats difficile.

Même si l'efficacité du procédé est indéniable, la forte consommation d'énergie (jusqu'à ~140 $\text{kWh.kg}_{\text{MS}}^{-1}$) a terni l'intérêt pour cette méthode. Néanmoins, des améliorations de la consommation énergétique peuvent être faites en traitant des suspensions concentrées en

matière sèche (100g.l⁻¹) (Postma *et al.*, 2017) et en choisissant les conditions optimales (taille de billes, vitesse d'agitation, durées de traitement) (Montalescot *et al.*, 2015). La consommation énergétique est fortement liée à l'espèce de microalgue traitée : par exemple 0,4 kWh.kg_{MS}⁻¹ pour *T. suecica* contre 1,42 kWh.kg_{MS}⁻¹ et 1,78 kWh.kg_{MS}⁻¹ respectivement pour *C. vulgaris* et *N. oleoabundans* (Postma *et al.*, 2017).

2.4 Bilan sur les méthodes de destruction cellulaire

Pour le choix d'une méthode de destruction dans le bioraffinage, un critère important est la préservation des molécules ciblées. Selon Phong *et al.* (2017b), le broyage à billes, l'ultrasonication, la lyse enzymatique, l'utilisation de liquides ioniques sont des méthodes de destruction douce. En ce qui concerne la libération sélective des produits, on peut citer le broyage à billes, les champs électriques pulsés (Postma *et al.*, 2016), les méthodes enzymatiques et chimiques.

D'autres critères tels que la consommation énergétique, la concentration des suspensions traitées, et la facilité d'extrapolation sont importants pour l'industrialisation. Le Tableau 9 récapitule les avantages et inconvénients des différentes méthodes de destruction des microalgues.

Tableau 9 : Comparaison qualitative des méthodes de destruction modifié de (Günerken *et al.*, 2015) Très diluée < 1 g.l⁻¹ ; Diluées 1-10 g.l⁻¹ ; concentrée > 10 g.l⁻¹. La douceur d'une méthode fait référence ici à des effets thermiques, mécaniques ou chimiques modérés qui n'altèrent pas la fonctionnalité des biomolécules

Méthode de destruction	Douceur	Libération sélective de produit	Concentration optimale (MS)	Consommation énergie	Facilité d'extrapolation
Broyage à billes	+/-	+/-	Concentrée	Elevée/moyenne	+
Broyage haute pression	+/-	-	Diluée/concentrée	Elevée/moyenne	+
Broyage haute vitesse	-	-	Diluée	Elevée/moyenne	+
Ultrasons	+/-	-	Diluée	Moyenne/basse	+/-
Microondes	+/-	-	Diluée	Elevée/moyenne	+/-
Champs électriques pulsés	+/-	+/-	Très diluée	Elevée/moyenne/basse	+/-
Lyse enzymatique	+	+	Diluée	Basse	+
Traitement chimique	+/-	+	Diluée/concentrée	Moyenne/basse	+

En résumé, il n'existe pas de méthode idéale de destruction cellulaire. Généralement les méthodes très efficaces (méthodes mécaniques) consomment beaucoup d'énergie et ne permettent pas une libération sélective. Des améliorations peuvent être faites en maîtrisant les conditions opératoires comme pour le cas du broyage à billes. De plus de nouvelles méthodes potentielles de destruction restent à explorer : la décompression explosive, la microfluidisation, la technologie des arcs pulsés, les membranes à polymères cationiques (Phong *et al.*, 2017b).

3. Modélisation de l'opération de broyage à billes

3.1 Approches de modélisation

La multiplicité des paramètres opératoires du broyage à billes est source d'efforts expérimentaux coûteux pour optimiser les conditions de broyage. Différentes approches de modélisation ont donc été développées afin de réduire les essais expérimentaux préalables à la production industrielle.

3.1.1 *Modèles empiriques*

La modélisation empirique est régulièrement utilisée pour le broyage à billes. Les mécanismes de broyage ne sont pas pris en compte et les paramètres de modèles sont déterminés à partir de résultats expérimentaux et valables uniquement dans les plages de paramètres étudiées. Par exemple la modélisation en utilisant des méthodes d'analyses statistiques telles que l'ANOVA (ANalysis Of Variance), permettent de déterminer l'impact des différents paramètres (significatif, positif ou négatif) et leurs interactions éventuelles. Cette approche a été utilisée par Pan *et al.* (2017) pour modéliser l'importance des paramètres sur le broyage de *Nannochloropsis*. Elle a également été utilisée pour l'effet de la vitesse d'agitation et de la concentration en biomasse sur les constantes cinétiques de destruction et de libération des protéines de *C. vulgaris* (Postma *et al.*, 2015). Doucha and Lívanský (2008) ont modélisé les taux de destruction de *C. vulgaris* sous forme de produits de puissances des paramètres opératoires (débit, diamètre billes, taux de remplissage, vitesse d'agitation et concentration des suspensions) pour différentes tailles et géométries de broyeurs.

L'utilisation de modèles basés sur des bilans de populations est également une approche courante en particulier pour le broyage de matériaux cristallins. En général, les particules (cellules et débris pour la destruction de microorganismes) sont subdivisées en classes de taille. Les fonctions de sélection (vitesses spécifiques de broyage) et de broyage (distribution de taille et nombre de fragments) pour chaque classe de taille sont déterminées empiriquement. Cette approche a été utilisée pour le broyage de matériaux (Bilgili *et al.*, 2006; Capece *et al.*, 2011; de Carvalho and Tavares, 2013; Lindberg *et al.*, 2017) et pour le broyage de la microalgue

Nannochloropsis. sp (Pan *et al.*, 2017). Ces derniers ont déduit grâce aux fonctions de broyage que l'impact et la compression était responsable de la destruction des plus grosses cellules tandis que le cisaillement était dominant pour la production de particules fines (Figure 17).

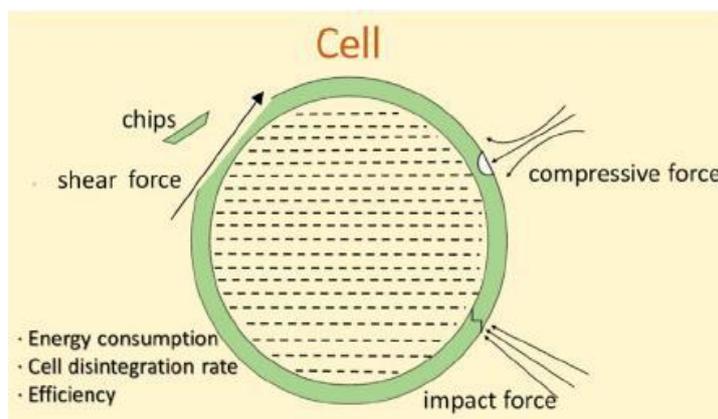


Figure 17 : Différents mécanismes de destruction cellulaire proposés par (Pan *et al.*, 2017)

Une synthèse qualitative de l'effet des différents paramètres du broyage sur l'efficacité du broyage à bille est présentée dans le Tableau 10. Il ressort des études empiriques que la taille optimale des billes dépend du microorganisme étudié : par exemple $\sim 0,4$ mm pour *C. vulgaris* selon Postma *et al.*(2015) et 1,3 mm pour *P. centrum* selon (Montalescot *et al.*, 2015). Mais en général, les plus petites billes permettent une meilleure utilisation de l'énergie (Postma *et al.*, 2017). L'effet de l'augmentation de la concentration de biomasse sur l'efficacité du broyage est mitigé : selon Doucha and Lívanský (2008), il serait positif pour les géométries à disques et à doigts et négatif pour un broyeur conique. Alors que Postma *et al.* (2015) ont constaté un effet positif de la concentration pour la même microalgue. L'augmentation du taux de remplissage a un impact favorable sur l'efficacité du broyage tant que l'on n'atteint pas des valeurs limitant le degré de liberté des billes: cette valeur est $\sim 0,6$ (volume de billes / volume de chambre de broyage) pour des billes sphériques selon Eskin *et al.*(2005).

Tableau 10 : Effet qualitatif des principaux paramètres de broyage sur l'efficacité de destruction des microorganismes (Doucha and Lívanský, 2008; Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2015)

Paramètre	Impact sur l'efficacité	Effet sur l'efficacité du broyage
d_B	***	\pm (optimum)
v	**	+
C	*****	\pm (valeur limite)
φ	-	+ (limite ~ 85 %)
t ou n	****	+
ρ_B	**	+

3.1.2 Modèles semi-empiriques

Avec un modèle de puissance basé sur le cisaillement, Radziszewski (2015) a déduit des corrélations cohérentes entre les consommations expérimentales et la viscosité du mélange fluide-produit-billes (en fonction des diamètres, densités et de la concentration de la suspension), du volume de cisaillement (donné par la géométrie des agitateurs) et de la vitesse d'agitation. Son étude validée pour différentes géométries de broyeur verticaux n'a cependant pas pris en compte l'efficacité de broyage.

Une approche dite micro-hydrodynamique a été utilisée par Eskin *et al.*(2005). Ils combinent le mouvement des fluides dans la chambre de broyage avec la consommation énergétique. Les conditions considérées (petites billes et vitesse d'agitation élevée) impliquent d'avoir un régime de fonctionnement où les billes sont uniformément dispersées : la dispersion turbulente l'emporte sur la stratification radiale causée par la force centrifuge. Les mécanismes de dissipation de l'énergie cinétique turbulente considérés sont : le frottement visqueux entre billes et suspension chargée ; la compression de la suspension lorsque deux billes sont en approche ; les collisions partiellement inélastiques entre les billes. Ces hypothèses permettent avec une approximation adimensionnelle de dériver les différents termes de dissipation correspondant. Les vitesses et les fréquences d'oscillations des billes en sont déduites connaissant la puissance à l'arbre (mesurée expérimentalement ou estimée par simulation numérique).

Les modèles de stress sont des modèles qui utilisent une approche similaire. Ils sont basés sur la connaissance des gradients de vitesses entre les éléments de broyeurs fixes ou en mouvement et sur les énergies de stress tenant compte de la vitesse relative des billes (Breitung-Faes, 2017). Ces modèles permettent de prédire la consommation énergétique et l'efficacité de broyage à travers 3 grandeurs : l'énergie de stress, la fréquence de stress et l'énergie spécifique consommée par le broyeur. Les expressions de ces grandeurs sont dérivées en fonction des paramètres du broyage à partir des mécanismes de broyage et d'hypothèses simplificatrices. Le développement de ces modèles sera détaillé dans la section 3.2 de ce chapitre.

3.1.3 Modèles basés sur les simulations numériques

Ce sont des modèles basés sur la simulation numérique du mouvement des fluides (CFD) couplée à la méthode des éléments discrets qui permet de prendre en compte le mouvement des billes. La distribution des énergies de stress, la fréquence de stress ainsi que la distribution spatiale des billes peuvent en être déduits. Beinert *et al.*(2015) ont utilisé cette approche et ont pu corréliser les valeurs obtenues par simulation numérique de l'énergie de stress, du nombre de contacts et de la puissance utilisable pour le broyage aux valeurs maximales données par le

modèle analytique de Stress. Les auteurs ont également abordé une analyse détaillée de la nature des contacts entre billes (Figure 18) ayant permis de quantifier les contacts et leur nature pendant le broyage.

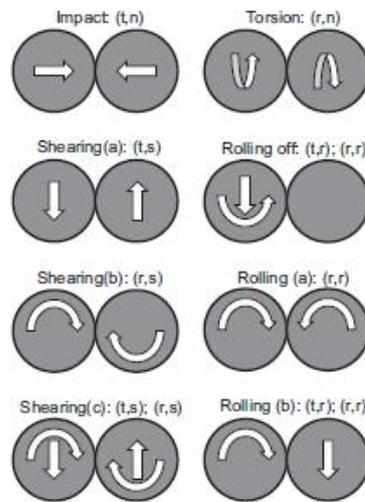


Figure 18 : Différents contacts idéaux possibles entre billes et les directions correspondantes des vitesses (Beinert *et al.*, 2015)

Par ailleurs, une approche multi-échelles a été utilisée pour modéliser les broyeurs à billes agités (Beinert *et al.*, 2017). L'échelle micro (échelle des particules) a permis de prédire l'influence du matériau, de la taille et forme des particules et d'en déduire les énergies et forces de fractures ; l'échelle méso (des billes) a mis en relation les conditions macroscopiques d'écoulement avec et la dynamique des particules de l'échelle micro. Elle a également permis de déterminer les forces de compression et les probabilités de capture des particules. L'échelle macro (broyeur) quant à elle permet d'avoir une information sur la distribution des énergies de stress à partir de calcul numérique des vitesses relatives des billes. A l'échelle du procédé, les informations des autres échelles sont utilisées pour déterminer la distribution de taille des particules par un modèle de bilan de population.

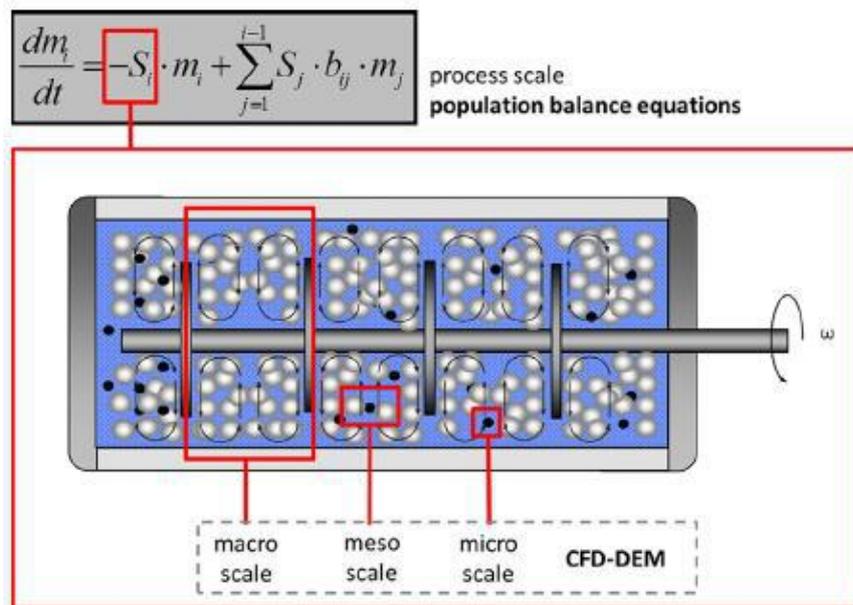


Figure 19 : Schéma du principe de modélisation multi échelles utilisée par Beinert *et al.*(2017)

Les différentes approches de modélisation ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Les modèles empiriques relativement simples nécessitent un grand nombre d'expériences et restent inutilisables pour des fins d'extrapolation. Les approches semi-empiriques permettent de prendre en compte les mécanismes de broyage et le changement d'échelle à condition que toutes les hypothèses simplificatrices soient vérifiées et utilisées avec précaution. Enfin, les méthodes basées sur la simulation numérique, sont celles qui apportent plus de précision pour la prédiction du broyage mais demandent de gros investissements en puissance de calcul numérique. L'approche multi-échelle semble la plus complète pour la modélisation du broyage à billes mais reste également complexe. Pour ces raisons, dans nos travaux nous avons choisi une approche semi-empirique basée sur les modèles de stress qui permettent avec des relations simples de modéliser et d'extrapoler les résultats du broyage en fonction des paramètres opératoires.

3.2 Développement du modèle de stress

3.2.1 Mouvement des billes et mécanismes de broyage

3.2.1.1 Mouvement des billes

Afin de comprendre les mécanismes de broyeur, le mouvement du fluide et des billes dans les broyeurs a été étudié par simulation numérique par plusieurs auteurs : Blecher and Schwedes (1996) ont commencé par des simulations du mouvement du fluide uniquement, puis avec des simulations du mouvement de billes individuelles. Ces simulations ont été faites en résolvant les équations de conservation de masse et de quantité de mouvement par la méthode

des volumes finis. Les champs de vitesse du fluide ont montré que les forts gradients de vitesse et les dissipations de l'énergie étaient majoritairement près des disques et près de la paroi (Figure 20). Ces régions représentent moins de 20% du volume des chambres de broyage et dissipent plus de 80% de l'énergie consommée par le broyeur.

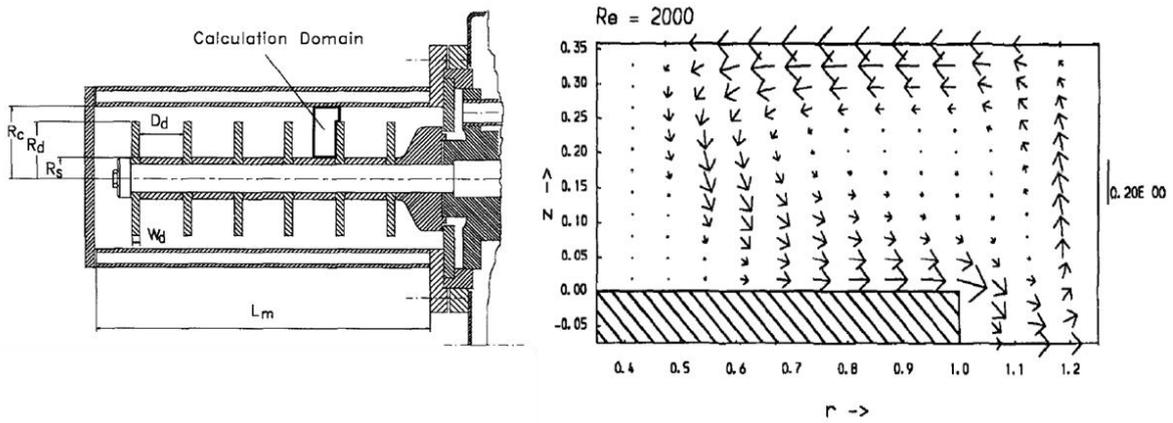


Figure 20 : Vitesses axiales et radiales pour $Re=2000$ broyeur avec disques d'agitation (Blecher and Schwedes, 1996)

L'étude de la trajectoire de billes de différentes tailles (0,25-2 mm) en régime laminaire a montré que les petites billes suivent quasiment le mouvement du fluide et passent par les zones de hautes densités d'énergie. Les plus grandes billes sont quant à elles influencées par les forces centrifuges et possèdent des trajectoires moins larges minimisant leur passage dans les zones de haute densité énergétique (énergie locale rapportée à la moyenne).

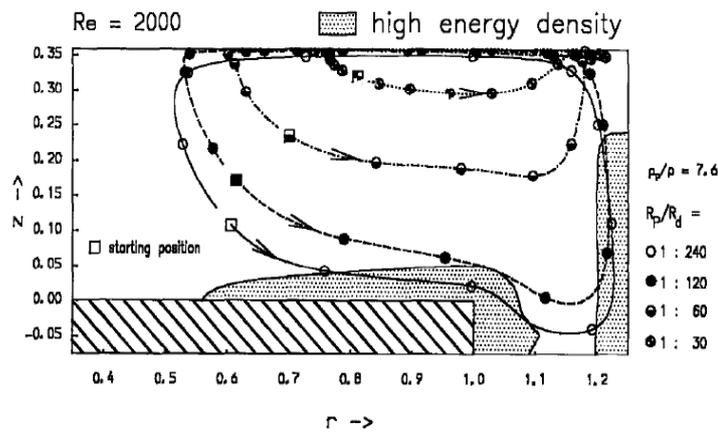


Figure 21 : Trajectoires de billes de différentes tailles pour $Re=2000$ (Blecher and Schwedes, 1996)

Bien que ces simulations n'aient été faites qu'avec des billes individuelles (Kwade, 1999a) elles laissaient prévoir une meilleure efficacité des petites billes par rapport aux plus grandes billes.

3.2.1.2 Mécanismes de broyage

Les travaux de Kwade (1999a) ont comparé trois mécanismes potentiellement responsables du broyage de matériaux cristallins dans les broyeurs à billes. Les contraintes de cisaillement de fluides ont été considérées insuffisantes pour broyer des matériaux cristallins. Les particules sont broyées à cause des contraintes provenant de :

- Collisions de billes accélérées de l'arbre d'agitation vers les parois avec des billes de vitesse nulle ou faible à la paroi.
- La compression des billes contre les parois à cause de l'accélération centrifuge : le broyage est dû à l'action d'une force normale.
- Des billes ayant des vitesses tangentielles élevées entrant en collision avec des billes de plus faibles vitesses : le piégeage de particules entre des billes en collision provoque alors leur broyage.

La comparaison des intensités de stress de ces trois mécanismes avec les énergies et forces requises pour broyer du calcaire a montré que le mécanisme prépondérant est le piégeage de particules entre billes en mouvement tangentiel qui entrent en collision (Kwade, 1999a).

3.2.2 Dérivation des expressions de SE et SN

Initialement, l'énergie spécifique fournie au broyeur était utilisée pour prédire les effets de la vitesse d'agitation, de la concentration des suspensions et de la densité des billes sur le broyage de matériaux cristallins (Figure 22).

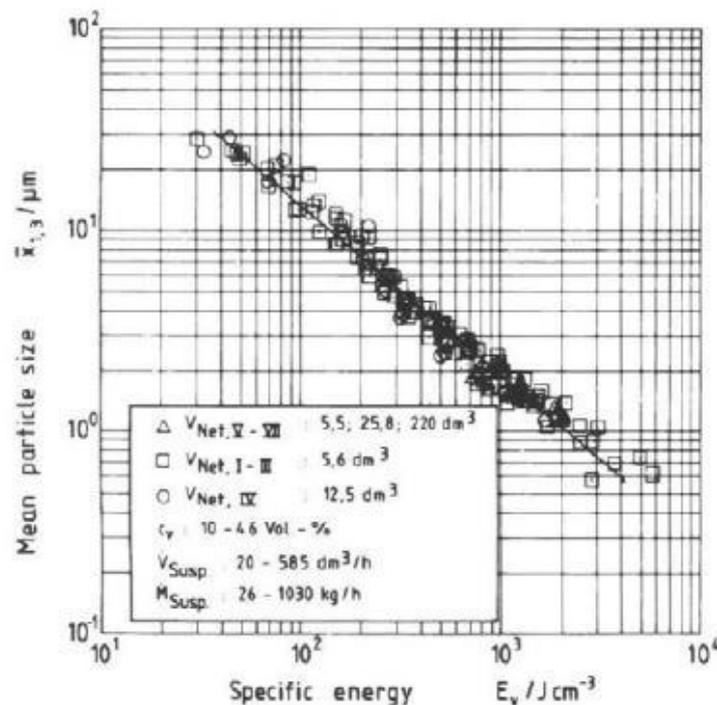


Figure 22 : Taille moyenne des particules $\bar{x}_{1,3}$ en fonction de l'énergie spécifique E_v pour différentes géométries de broyeurs et paramètres opératoires (Schwedes and Bunge, 1992)

Plus tard, l'influence de la taille des billes a été mise en évidence et ne pouvait pas être décrite uniquement par l'énergie spécifique fournie mais avec l'intensité de stress des billes (Kwade *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 2001).

D'autre part, pour la dispersion de pigments et la destruction cellulaire les études ont montré que l'impact de tous les paramètres incluant la taille des billes pouvait être décrit par la fréquence de stress ou le nombre de stress dans certaines plages opératoires (Figure 23).

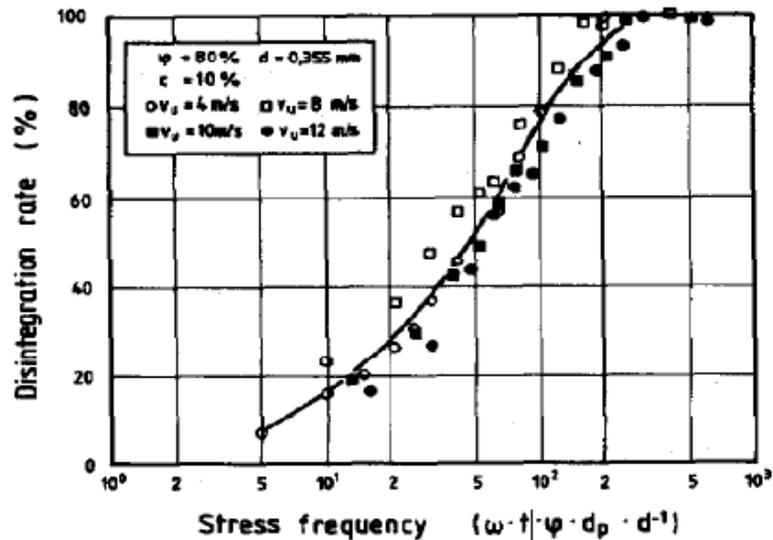


Figure 23 : Corrélation entre taux de destruction cellulaire de *Arthrobacter sp* avec la fréquence de stress à différentes vitesses d'agitation (Bunge *et al.*, 1992)

Finalement, il a été constaté que la finesse du produit broyé était la même si l'on fixe l'intensité de stress et le nombre de stress ou l'intensité de stress et l'énergie spécifique fournie.

En résumé, l'efficacité du broyage de matériau ou la destruction cellulaire est déterminée par deux conditions : la fréquence des événements stressants doit être suffisante pour broyer les particules et les fragments qui en résultent et l'énergie des stress doit être suffisante pour vaincre la résistance des particules. A partir de ces constats les modèles de stress ont été définis selon deux points de vues (Kwade, 2003) décrits ci-dessous.

- Le modèle de stress lié au broyeur

Cette formulation du modèle permet de caractériser le broyeur indépendamment de la taille et des propriétés des particules. Elle repose sur la nature des événements stressants (cisaillement, compression ou impact), leur nombre par unité de temps (SF_B) et l'amplitude de l'énergie transmise aux particules à chaque événement stressant. Le produit de la fréquence de stress avec le temps moyen de broyage permet d'obtenir le nombre de stress du broyeur. Le temps de broyage requis pour atteindre une certaine qualité de produit dépendant des propriétés des particules, seule la fréquence de stress est propre au broyeur et à ses conditions.

L'énergie de stress SE est l'énergie transférée à une ou plusieurs particules pendant un évènement stressant SF_B et SE peuvent être décrits uniquement par des distributions.

- Modèle de stress lié au produit

Les fréquences et énergies de stress définies précédemment ne prennent en compte ni le nombre de particules stressées à chaque évènement stressant, ni la taille des particules. Pourtant les propriétés des particules sont importantes ainsi que l'énergie spécifique transférée aux particules (énergie rapportée à la masse ou au volume de particules) qui doit permettre de vaincre leur résistance. Ainsi, le modèle de stress lié au produit tient compte de la taille des particules, et du nombre de particules stressées à chaque évènement stressant. Il utilise donc le nombre de stress par unité de particule dans la suspension initiale SN_p et l'amplitude de l'énergie spécifique ou la force spécifique à chaque évènement SI . A nouveau, les grandeurs SN_p et SI sont distribuées dans le broyeur. L'intensité de stress détermine l'efficacité de transfert de l'énergie spécifique aux particules.

A noter que l'intensité de stress des particules SI_p est définie comme une énergie spécifique par unité de volume (ou de masse de particule) (Breitung-Faes and Kwade, 2014).

$$SI_p \propto \frac{SE}{d_p^3} \quad (2)$$

Où $d_p(m)$ désigne la taille moyenne des particules en alimentation

Finalement, l'énergie de stress et l'intensité de stress sont proportionnelles lorsqu'on travaille avec les mêmes particules (taille moyenne initiale fixe) et lorsqu'une seule particule est contrainte à chaque évènement stressant.

Pour un broyeur à billes fonctionnant en batch, le nombre de stressa été approché par la relation :

$$SN = \frac{N_c \times P_s}{N_p} \quad (3)$$

Avec

N_c : le nombre de collisions entre billes

P_s : la probabilité qu'une particule soit capturée entre deux billes et que l'intensité soit suffisante pour la casser

N_p : le nombre de particules dans le broyeur

Le nombre de contact est supposé proportionnel au nombre de billes N_B (-), à la fréquence d'agitation $n(s^{-1})$ et à la durée du traitement $t(s)$.

$$N_c \propto N_B \cdot n \cdot t \quad (4)$$

Avec le nombre de billes donné par :

$$N_B = \frac{\varphi(1 - \varepsilon) \cdot V}{\left(\frac{\pi}{6}\right) \cdot d_B^3} \quad (5)$$

$\varepsilon(-)$: la porosité du lit de billes

$V (m^3)$: volume de la chambre de broyage

φ : le taux de remplissage des billes

$d_B(m)$: le diamètre des billes

Le nombre de particules est donné par

$$N_p \propto V \frac{(1 - \varphi \cdot (1 - \varepsilon))c_v}{V_p} \quad (6)$$

Où $c_v(-)$ désigne la fraction volumique des particules dans la suspension,

V_p le volumemoyen des particules à l'alimentation.

La probabilité P_s dépend du type de broyage.

Pour le broyage de matériaux cristallins on considère que le broyage résulte principalement des contraintes normales (forces d'impact et de compression) lorsque les particules sont piégées dans le volume actif (Figure 24) entre deux billes en collision. Il a été également considéré que pour des suspensions diluées (c_v) avec des particules suffisamment grosses, une seule particule est capturée à chaque collision. Dans ce cas, la probabilité P_s est proportionnelle au diamètre des billes d_B .

$$P_s \propto d_B \quad (7)$$

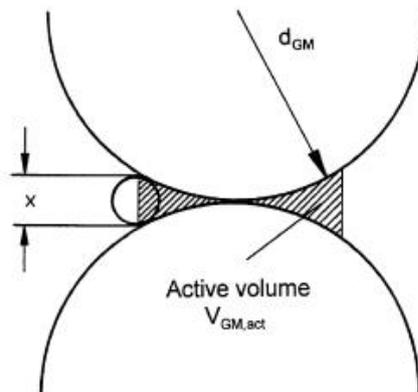


Figure 24 : Volume actif entre deux billes en collision (Kwade and Schwedes, 2002)

Dans le cas de la désagglomération de particules ou de la destruction cellulaire, les contraintes de cisaillement sont suffisantes (Bunge *et al.*, 1992). De plus, contrairement au

broyage des matériaux cristallins, il n'y a que deux états possibles : particules désagglomérées (respectivement cellules détruites) ou intactes. Les états intermédiaires potentiels sont supposés ne durer que quelques instants. Ainsi, la probabilité P_s est supposée proportionnelle la surface des billes.

On peut supposer que le nombre de contacts est proportionnel au nombre de révolutions de l'agitateur et au nombre de billes.

$$P_s \propto d_B^2 \quad (8)$$

En combinant les équations (3), (4), (5), (6) et (7) d'une part et les équations (3), (4), (5), (6) et (8) d'autre part, on déduit les expressions de SN_B (respectivement SN_D) pour le broyage de matériaux cristallins et pour la désagglomération /ou la destruction cellulaire.

- Pour le broyage de matériaux cristallins SN_B

$$SN_B \propto \frac{\varphi(1 - \varepsilon)}{(1 - \varphi(1 - \varepsilon)) \cdot c_v} \frac{n \cdot t}{d_B^2} \quad (9)$$

- Pour la destruction cellulaire et la désagglomération de particules SN_D

$$SN_D \propto \frac{\varphi(1 - \varepsilon)}{(1 - \varphi(1 - \varepsilon)) \cdot c_v} \frac{n \cdot t}{d_B} \quad (10)$$

A noter que le volume moyen des particules à l'alimentation V_p n'est pas conservé parmi les paramètres significatifs de SN_B et SN_D .

Par ailleurs, le mécanisme prédominant de broyage est lié aux hauts gradients de vitesses tangentielles des billes. De plus, étant donné que la taille ou la masse des particules évolue au cours du temps, il a été considéré plus adéquat de dériver une expression caractéristique pour SE plutôt que pour SI (Kwade and Schwedes, 2007).

Une approximation a donc été faite en assumant que l'énergie de stress disponible pour le broyage est proportionnelle à l'énergie cinétique des billes. Pour déterminer l'énergie cinétique des billes des hypothèses supplémentaires ont été émises :

- Des particules individuelles et non des lits reçoivent des énergies de stress suffisantes et donc le volume de particule stressé est indépendant de la taille des billes.
- La vitesse tangentielle des billes est proportionnelle à la vitesse en bout de pale de l'agitateur.
- Le diamètre des disques d'agitation est supposé constant.
- Le déplacement de suspension entre deux billes en approche ne réduit pas significativement la vitesse des billes.
- L'élasticité du matériau à broyer est négligeable devant l'élasticité des billes

Ainsi, l'énergie de stress a été exprimée par :

$$SE \propto SE_B = d_B^3 \rho_B v^2 \quad (11)$$

Il faut noter que l'énergie de stress exprimée représente la valeur maximale d'énergie disponible pour le broyage des particules.

Si l'élasticité du matériau à broyer est du même ordre que celle des billes avec l'hypothèse de chocs élastiques entre les billes l'énergie de stress est exprimée par :

$$SE \propto SE_P = d_B^3 \rho_B v^2 \left(1 + \frac{Y_p}{Y_B}\right)^{-1} \quad (12)$$

Avec ρ_B la masse volumique des billes

v ($m \cdot s^{-1}$) la vitesse périphérique de l'agitateur

Y_p et Y_B les modules de Young respectifs des particules et des billes

Le nombre de stress et l'énergie de stress à chaque contrainte déterminent les résultats de broyage. L'énergie spécifique E_s (J par kg de produit) a donc été exprimée comme :

$$E_s \propto \frac{SE \cdot SN}{m_p} \quad (13)$$

Ainsi, pour une énergie de contrainte donnée on peut corréliser la finesse du produit avec le nombre de contrainte ou l'énergie spécifique fournie. Les études expérimentales obtenues pour le broyage de calcaire ont montré que pour atteindre une certaine finesse de produit, il existe une énergie de stress optimale pour laquelle l'énergie spécifique fournie est minimale (Kwade and Schwedes, 2007).

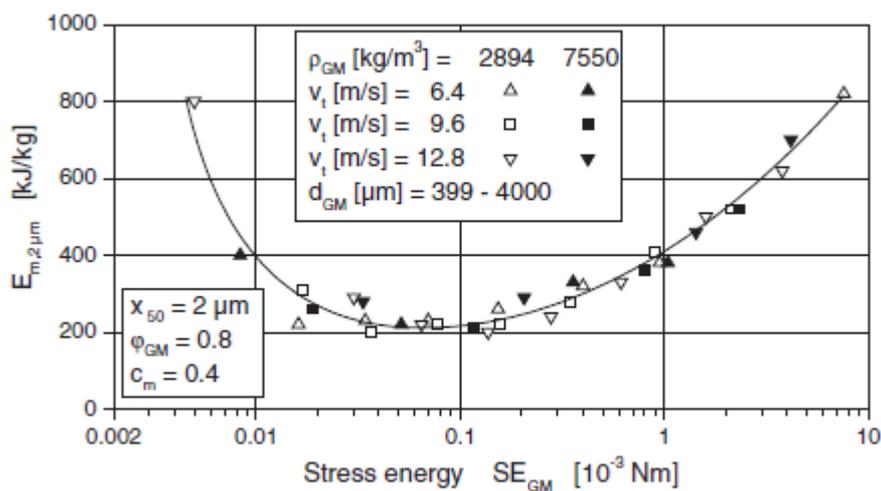


Figure 25 :Energie de stress requise pour obtenir une taille moyenne de produit de 2 µm pour le broyage de calcaire (Kwade, 2003).

3.2.3 Modèle de stress amélioré et transposition des résultats de broyage

Les expressions d'énergie de stress définies précédemment ne permettent ni de décrire les effets de la viscosité des suspensions, ni les changements de géométries ou d'équipements de broyeurs. Ainsi, pour passer d'un équipement à un autre il faut tenir compte des spécificités de l'équipement :

- La nature et le types de contraintes
- L'efficacité des transferts énergétiques

Des améliorations au modèle de stress permettant l'extrapolation des résultats de broyage entre plusieurs échelles et différentes géométries ont été introduites par (Breitung-Faes and Kwade, 2014). L'utilisation de l'énergie de stress des billes SE_B comme valeur caractéristique a révélé des limites pour l'extrapolation. En effet, des broyeurs ayant les mêmes SE_B et E_s de différentes géométries ou des échelles différentes (Stender *et al.*, 2004) n'ont pas permis d'avoir la même qualité de broyage (Figure 26).

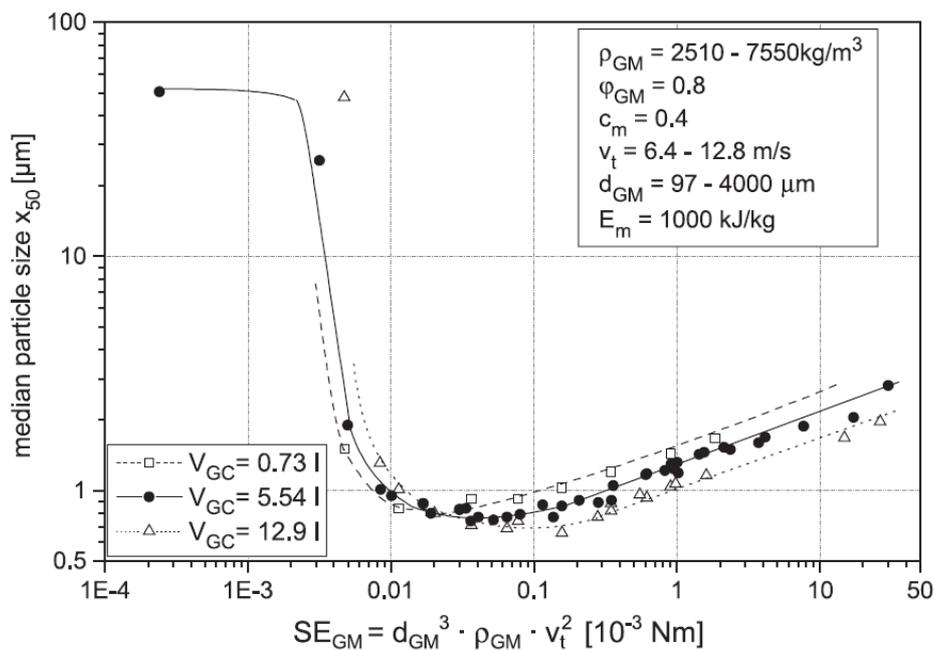


Figure 26 : Influence de la taille de la chambre de broyage sur la relation entre finesse du produit et l'énergie de stress SE (Stender *et al.*, 2004)

La géométrie de la chambre de broyage et du système d'agitation a une forte influence sur les forces de cisaillement, les distributions de l'énergie des événements stressants. Les valeurs moyennes de ces paramètres varient beaucoup d'une géométrie et/ou d'une échelle à une autre. Un nouveau critère plus représentatif de la distribution des énergies de stress a donc été introduit dans un modèle de stress amélioré par Breitung-Faes and Kwade (2013, 2014) et

Breitung-Faes (2017) : l'énergie de stress moyenne fournie aux particules SE_p dont la détermination a été détaillée par Stender *et al.*(2004) est défini comme :

$$\overline{SE_p} = f_B \cdot SE_B \cdot \left(1 + \frac{E_P}{E_B}\right) \quad (14)$$

Où f_B est un facteur prenant en compte la distribution de SE dans le broyeur et dépendant de la géométrie du broyeur et des conditions opératoires. Il peut être déterminé à partir des simulations numériques du mouvement du fluide et des billes. Une méthode de détermination de f_B est détaillée par Stender *et al.*(2004).

L'énergie de stress optimale pour un matériau donné (juste suffisante pour le broyer) peut être estimée en fonction de ses propriétés : la force de compression σ_{CS} (N.m⁻²), la taille minimale possible de particules x_{min} (m), la taille des particules non broyées x (m) et la taille moyenne x_{50} de produit (Breitung-Faes and Kwade, 2013, 2014).

$$\frac{\overline{SI}_{p,opt}}{\sigma_{CS}} = \frac{\overline{SE}_{p,opt}}{x^3 \sigma_{CS}} = \frac{x_{50}}{x_{min}} \quad (15)$$

Par ailleurs, l'énergie spécifique réellement reçue par les particules $E_{s,p}$, efficace pour le broyage ne représente qu'une faible fraction de l'énergie spécifique consommée par le broyeur. En effet, il existe plusieurs mécanismes responsables des pertes d'énergie (Figure 27).

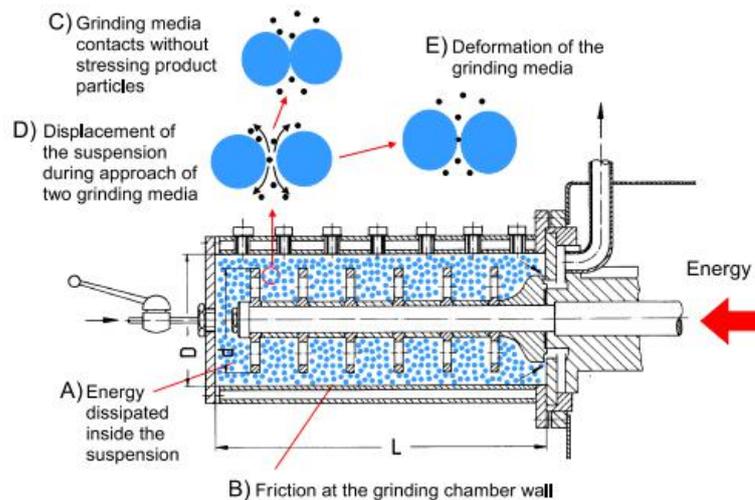


Figure 27 : Sources de dissipation d'énergie dans les broyeurs à billes (Kwade, 2004)

Un coefficient de transfert d'énergie v_E global résumant les pertes d'énergie a été défini (Kwade, 2003; Breitung-Faes, 2017) :

$$E_s = v_E E_{s,p} \quad (16)$$

$$v_E = v_B \cdot v_{suspension} \cdot v_p \quad (17)$$

v_B représente les pertes d'énergies dues aux frictions (billes-billes ou billes-paroi),

$v_{suspension}$ les pertes d'énergies liées à l'augmentation de la viscosité,

v_p les pertes d'énergies par déformation des billes et dans les contacts sans produit.

Le coefficient v_B a été approché par le ratio de l'aire du rotor A_{rotor} avec le volume de la chambre de broyage V :

$$v_B \sim \frac{A_{rotor}}{V} \quad (18)$$

En supposant que l'augmentation d'énergie consommée liée au fonctionnement avec une suspension chargée en solide par rapport à l'énergie du liquide pur est uniquement dissipée dans la suspension, $v_{suspension}$ est exprimé

$$v_{suspension} \approx \frac{(P - P_0)_L}{(P - P_0)} \quad (19)$$

$(P - P_0)_L$ la puissance nette consommée avec un liquide pur

$(P - P_0)$ la puissance nette consommée par la suspension chargée

v_p est également estimé pour des gammes de concentration de suspensions raisonnables

$$v_p \approx \left(1 + \frac{E_p}{E_B}\right) \quad (20)$$

En résumé, l'énergie de stress optimale pour broyer un matériau dépend de ses propriétés (taille, élasticité) et peut être déterminé expérimentalement avec quelques tests. Ainsi en utilisant la notion d'énergie de stress moyenne (qui dépend de la géométrie du broyeur) et les facteurs de conversion de l'énergie mentionnés précédemment, les résultats de broyage peuvent être transposés d'une échelle à une autre ou d'une géométrie à une autre.

CONCLUSION

L'état de l'art sur le bioraffinage des microalgues a permis de mettre en évidence l'importance du downstream processing dont les coûts vont jusqu'à 50 % des coûts totaux des procédés. La première étape du DSP en voie humide est la lyse cellulaire. Il existe une multitude de méthodes et le broyage à billes peut être classé parmi les méthodes prometteuses dans le contexte de bioraffinage. Le broyage à bille permet d'obtenir une grande efficacité de broyage et offre la possibilité de choisir des conditions douces et sélectives pour la libération des molécules d'intérêt. Cependant, le procédé requiert de nombreux essais pour choisir les conditions optimales du fait des nombreux paramètres entrant en jeu. Il s'avère donc primordial de développer des méthodes de modélisation et d'optimisation.

Les modèles empiriques nécessitent de faire de nombreux essais et ne permettent pas l'extrapolation des résultats. Les modèles basés sur la simulation numérique permettent de comprendre en détail les mécanismes de broyage et de prédire les conditions de broyage mais demandent de longs temps de calculs et des simulations pour chaque condition opératoire. Les modèles semi-empiriques constituent un bon compromis et permettent par des analyses adimensionnelles et la compréhension des mécanismes de dériver des grandeurs permettant de prédire les résultats de broyage et l'extrapolation des résultats. Parmi ces modèles, le modèle de stress couramment utilisé pour le broyage des matériaux cristallins permet l'optimisation énergétique et l'extrapolation des résultats de broyage.

La démarche générale de la thèse consiste à modéliser le broyage à billes des microalgues par une approche semi-empirique avec les modèles de Stress. Pour cela, le broyage haute pression est investigué en tant que méthode rapide de caractérisation préalable au broyage à billes. Une étude de l'impact des propriétés (taille, état physiologique) des cellules sur leur fragilité est réalisée. L'effet des paramètres opératoires sur l'hydrodynamique dans le broyeur à billes et la cinétique de broyage sont étudiés. Puis, le modèle de stress est adapté au cas des microalgues en incluant la distribution de taille des cellules et utilisé pour prédire les cinétiques de destruction et permettre le choix des paramètres opératoires lors d'un changement d'échelle.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes pour la production et le broyage à billes de microalgues

Résumé :

Ce chapitre décrit les méthodes de production de biomasse en photobioréacteurs dans des conditions ciblées pour l'étude du broyage à billes. Les biomasses de *P. kessleri*, et de *C. sorokiniana* sont produites en chémostat dans des photobioréacteurs de type airlift afin d'obtenir des cultures stables et de produire un volume suffisant pour les expériences de broyage. La production de *N. oleoabundans* est faite dans des conditions permettant la synchronisation de la division cellulaire afin d'évaluer l'importance de l'état physiologique sur la fragilité au broyage à billes. Par ailleurs, les conditions opératoires de broyage et les méthodes de comptage par classes de taille de cellules et d'évaluation des taux de destruction des différentes souches étudiées sont décrites. Les méthodes d'analyses de la chlorophylle *a* et des protéines solubles sont également abordées pour *C. sorokiniana* et *P. kessleri*. La méthode d'expérimentale de détermination de la distribution des temps de séjour dans le broyeur est présentée.

1.	Production de microalgues et suivi de culture :.....	63
1.1	Culture de <i>Parachlorella kessleri</i>	63
1.2	Culture synchronisée de <i>Neochloris oleoabundans</i>	64
1.3	Culture de <i>Chlorella sorokiniana</i>	67
1.4	Culture de <i>Chlorella vulgaris</i>	68
1.5	Suivi des cultures	68
2.	Broyage à billes	70
2.1	Description des équipements	70
2.2	Mise en œuvre du broyage à billes	71
3.	Analyse et caractérisation de la destruction cellulaire	72
3.1	Méthode de comptage et d'analyse de taille	72
3.2	Analyse biochimiques du broyat	80
4.	Etude de la distribution des temps de séjour.....	82
4.1	Généralités sur la distribution des temps de séjour.....	82
4.2	Protocole expérimental	83
4.3	Analyse des résultats.....	84
5.	Approche pour l'estimation des incertitudes	85

1. Production de microalgues et suivi de culture :

Les biomasses de *P. kessleri*, de *N. oleoabundans* et de *C. Sorokiniana* ont été produites dans des conditions spécifiques dans le cadre de cette thèse. La biomasse *C. vulgaris* également étudiée a été récupérée d'une production en cours sur la plateforme de R&D ALGOSOLIS. Les souches de microalgues d'eau douce utilisées (*P. kessleri*, *N. oleoabundans*, *C. sorokiniana* et *C. vulgaris*) ont été cultivées en conditions autotrophes dans un milieu BBM (Bold's Basal Medium) modifié (Van Vooren *et al.*, 2012) et formulé pour avoir une concentration de 2 g.l⁻¹ de biomasse. La composition finale du milieu est détaillée dans le Tableau 11. La biomasse de *Nannochloropsis oceanica* provient d'une culture en conditions de carence fournie sous forme de pâte congelée à 20 % de matière sèche par la société ARCHIMEDE RICERCHE (Italie).

Tableau 11 : Composition du milieu BBM modifié par (Van Vooren *et al.*, 2012)

Composés	Masse molaire(g.mol ⁻¹)	Concentration (mol.l ⁻¹)	Concentration (g.l ⁻¹)
Solution Macro-éléments			
NaNO ₃	85	8,02.10 ⁻³	6,82.10 ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	246,5	8,30.10 ⁻⁴	2,05.10 ⁻¹
CaCl ₂ , 2H ₂ O	147	1,55.10 ⁻⁴	2,28.10 ⁻²
Na ₂ EDTA, (H ₂ O) ₂	372,2	1,22.10 ⁻⁴	4,54.10 ⁻²
FeSO ₄ ,7H ₂ O	278	4,58.10 ⁻⁵	1,27.10 ⁻²
K ₂ HPO ₄	174,2	7,83.10 ⁻⁴	1,36.10 ⁻¹
KH ₂ PO ₄	136,1	8,80.10 ⁻⁴	1,20.10 ⁻¹
Additif 1			
ZnSO ₄ ,(H ₂ O) ₇	287,5	7,72.10 ⁻⁷	2,22.10 ⁻⁴
CuSO ₄	159,6	4,95.10 ⁻⁷	7,90.10 ⁻⁵
MnCl ₂ ,(H ₂ O) ₄	197,9	9,15.10 ⁻⁶	1,81.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	61,8	4,63.10 ⁻⁵	2,86.10 ⁻³
Co(NO ₃) ₂ ,(H ₂ O) ₆	291	1,51.10 ⁻⁷	4,39.10 ⁻⁵
Additif 2			
Na ₂ MoO ₄	205,9	1,06.10 ⁻⁶	2,18.10 ⁻⁴
Bicarbonate de sodium			
NaHCO ₃	84	5,00. 10 ⁻³	0,42

1.1 Culture de *Parachlorella kessleri*

1.1.1 Préculture :

La préculture de *P. kessleri* UTEX2229 (UTEX : Culture collection of algae at the University of Texas at Austin) est faite dans des erlenmeyers de 500ml dans lesquels pour un volume de 200 ml de milieu de culture, on ajoute 10 ml d'inoculum. La préculture est maintenue entre 7 et 14 jours à 50 μmoles_{h.v}.m⁻².s⁻¹ sous agitation afin d'atteindre une concentration suffisante en biomasse tout en maintenant la préculture en phase de croissance exponentielle.

1.1.2 Culture en Photobioréacteur

La production de *P. kessleri* est faite dans un photobioréacteur de type airlift en PMMA d'épaisseur 4 cm et de volume actif de 6 l dont le montage est décrit dans la Figure 28.

L'inoculation se fait avec 200 ml de préculture dans un volume de 1 l de milieu. L'intensité du flux lumineux est réglée à $70 \mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant 2 jours, puis augmenté progressivement pendant 3 à 5 jours pour atteindre l'intensité finale afin de permettre à la microalgue de s'adapter à son nouvel environnement. Le volume de culture est alors complété jusqu'à 5 l. Lorsque la culture atteint une concentration suffisante $>0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, l'alimentation en continu de milieu est déclenchée ainsi que la récolte qui se fait grâce à une canule permettant de fixer un niveau de culture par l'aspiration d'une pompe péristaltique (Figure 28).

La lumière est apportée par un ensemble de 6 lampes fluorescentes blanches dont la distance par rapport au réacteur et le voltage sont étalonnés en utilisant un quantum mètre (LICOR LI-250 A) pour obtenir un flux incident moyen de $210 \mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. La calibration se fait en moyennant le flux incident mesuré sur 12 points fixes de la plaque avant du réacteur. La régulation du pH autour de la valeur de consigne 7,5 se fait par injection de CO_2 grâce à une électrovanne pilotée par un programme LabVIEW. L'air et le CO_2 sont mélangés dans une chambre et permettent l'homogénéisation de la culture par bullage à travers une membrane poreuse. Un taux de dilution de $0,018 \text{ h}^{-1}$ a été choisi pour avoir une production en volume suffisante pour les expériences de broyage. La culture s'est stabilisée à une matière sèche de $0,8 \pm 0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$.

1.2 Culture synchronisée de *Neochloris oleoabundans*

La synchronisation de la culture a été effectuée afin de permettre l'étude de l'état physiologique (évolution dans le cycle cellulaire) sur la fragilité des cellules. Après plusieurs essais infructueux de synchronisation de la microalgue *P. kessleri*, les essais de synchronisation ont été orientés sur la reproduction d'un protocole de synchronisation de *N. oleoabundans*. Le protocole choisi pouvant être mis en œuvre au laboratoire et permettant d'avoir des quantités suffisantes de culture synchronisée pour les essais de broyage.

1.2.1 Principe de la synchronisation des cultures de microalgues

Une culture de microalgue est dite synchronisée si toutes les cellules sont dans le même état du cycle cellulaire. Les cellules évoluent alors simultanément et se divisent dans un laps de temps très court. Les premiers travaux de recherche décrivant la synchronisation de cellules du genre *Chlorella* datent de 1953 (Tamiya *et al.*, 1953). La synchronisation de la division cellulaire est un phénomène qui a été observé naturellement chez certaines algues vertes. Elle est considérée comme une évolution des algues se divisant par multiple fission. En effet, ces algues ont la capacité d'optimiser l'utilisation de l'énergie lumineuse en réalisant leur phase de

croissance lorsqu'elles sont exposées à la lumière et les phases de réplication d'ADN, division nucléaire et cellulaire à l'obscurité (Bisova and Zachleder, 2014). Les cultures synchronisées peuvent être utilisées comme un modèle amplifié de la cellule unique et permettent ainsi l'étude de la composition biochimique et du métabolisme des microorganismes dans les différentes phases de leur cycle cellulaire (de Winter *et al.*, 2013b).

Pour obtenir la synchronisation de la division cellulaire deux types d'approches sont utilisées :

- Les méthodes basées sur le tri cellulaire : elles consistent à trier à partir d'une culture hétérogène les cellules étant dans une même phase du cycle et par la suite à les mettre dans des conditions de culture permettant de conserver la synchronisation de la division. Le tri est basé sur les différences de propriétés (taille, de densité, quantité d'ADN...) des cellules dans les différentes phases de développement. Par exemple par centrifugation ou filtration différentielle de cultures en phase exponentielle des cultures synchronisées d'*Escherichia coli* ont été obtenues (Maruyama and Yanagita, 1956). En utilisant un système de canaux micro fluidiques, des cellules mammifères dans différentes phases de croissance ont pu également être séparées par Lee *et al.*(2014).
- Les méthodes induisant la synchronisation de la division : elles consistent à bloquer les cellules dans une phase donnée du cycle pendant une période par des agents chimiques bloquants (hydroxyurée, nocodazole, méthotrexate, aphidicoline)(Banfalvi, 2011)ou par carence nutritionnelle en la privant d'un élément essentiel à son développement (la lumière par exemple pour les micro algues).

La méthode communément utilisée pour la synchronisation des microalgues est l'alternance de cycles de lumière et d'obscurité (Tamiya *et al.*, 1953; PIRSON and LORENZEN, 1966; Garz *et al.*, 2012; Pokora and Tukaj, 2013). Les durées des phases d'obscurité et de lumière sont déterminées expérimentalement et la littérature propose plusieurs protocoles pour une même souche. La majorité des protocoles permettent la production de volumes faibles et la difficulté majeure dans la synchronisation des cultures de microalgues par cycle de lumière et d'obscurité est le maintien de la synchronisation dans le temps.

1.2.2 Méthode de synchronisation de *N. oleoabundans*

La préculture et la culture de *N. oleoabundans* UTEX 1185 a été réalisée dans des conditions reproduites à partir des expériences de (de Winter *et al.*, 2013, 2017) avec le réacteur airlift de la Figure 28. Le réacteur est couvert par un tissu occultant afin d'éviter les perturbations liées à l'éclairage de la salle.

Tableau 12 : Comparaison des conditions de culture de *N. oleoabundans* avec celles de De Winter *et al.*(2013, 2017)

	Conditions (de Winter <i>et al.</i> , 2013b; L. de Winter <i>et al.</i> , 2017)	Conditions étude
PFD	500 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	500 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
PFD moyen	200 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	200 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
Epaisseur	2 cm	4 cm
Volume de culture	1,8 l	5 l
Taux de dilution	0,067 h ⁻¹	0,058 h ⁻¹
Mode de dilution	Turbidostat	Semi-continu
Cycle Lumière/Obscurité	16 h/8 h	16 h/8 h
Apport en gaz	O ₂ , CO ₂	Air, CO ₂
Température	30°C	Non-réglée
pH	7,5	7,5

La synchronisation de la division a été obtenue en soumettant les cellules à des cycles de lumière/obscurité de 16 h/8 h. Le réacteur utilisé n'étant pas équipé pour un pilotage en mode turbidostat, la dilution est faite uniquement au cours de la phase « lumière » dans cette étude. Le taux de dilution a été réduit par rapport à celui de la référence (Tableau 12) pour limiter le risque de lessivage de la culture. En effet, d'après la loi de Beer-Lambert, en supposant un transfert unidirectionnel, le flux à une épaisseur z du réacteur peut être décrit selon l'équation (21) :

$$G(z) = G(0) \exp^{-MXz} \quad (21)$$

Avec

$G(0)$ et $G(z)$ respectivement les flux de photons incidents et à l'épaisseur z

M : le coefficient d'extinction

X : la concentration en biomasse

Pour un obtenir un même flux moyen \bar{G} de 200 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Par résolution numérique de l'équation(3), on constate que pour obtenir le même PFD moyen avec le même PFD incident, étant donné que le réacteur d'étude a une épaisseur 2 fois plus

importante que celle de la référence, il aurait fallu avoir une culture 2 fois plus diluée ($X \approx 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ au lieu de $0,6 \text{ g.l}^{-1}$ dans la référence).

$$\bar{G} = \frac{1}{e} \int_0^e G(0) \exp^{-MXz} dz \quad (22)$$

e étant l'épaisseur du réacteur.

Afin de vérifier la synchronisation de la division des cellules, un comptage cellulaire et une analyse de taille sont effectués chaque deux heures durant la phase d'obscurité avec la méthode décrite dans le paragraphe 3.1.

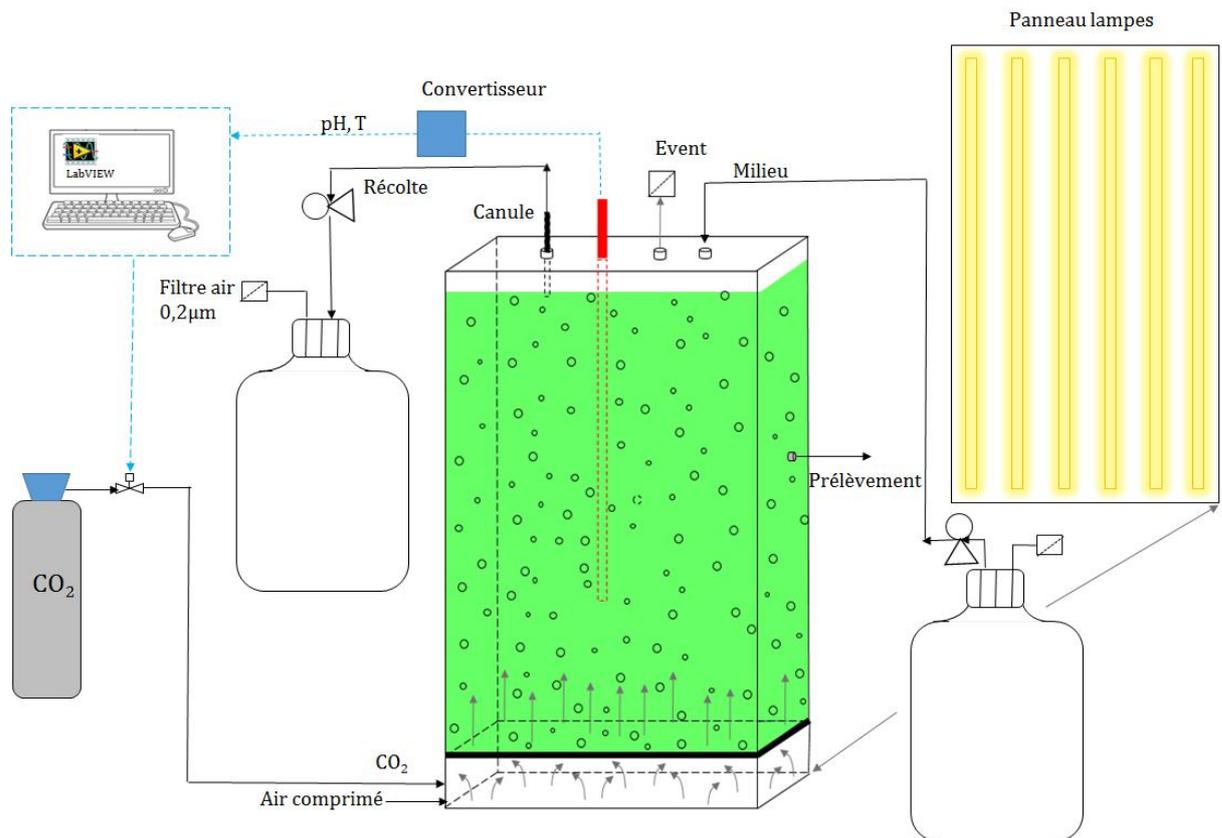


Figure 28 : Schéma du montage du réacteur airlift PMMA 6 l

1.3 Culture de *Chlorella sorokiniana*

La souche étudiée était *Chlorella sorokiniana* Shihira et Krauss (ACUF 318) fournie par la collection ACUF (Algae Collection University Federico II). La préculture a été préparée d'une façon analogue à celle de *Parachlorella kessleri*. La production de la biomasse a été faite en mode chémostat dans un photobioréacteur plan de type airlift caractérisé par un volume actif de 5 l et une épaisseur 3 cm. Le réacteur était éclairé par panneau constitué de 6 lampes fluorescentes de lumière blanche dont le voltage et la position ont été réglés pour avoir un flux lumineux incident de $280 \mu\text{moles}_{\text{hv}} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. En régime permanent avec un taux de dilution de $0,02 \text{ h}^{-1}$ la biomasse s'est stabilisée à $1 \pm 0,1 \text{ g.l}^{-1}$ de matière sèche.

1.4 Culture de *Chlorella vulgaris*

La biomasse de *Chlorella vulgaris* CCAP211/19 (CCAP : Culture Collection of Algae and Protozoa) utilisée provient d'une production en culture solaire durant la période de décembre 2017 à février 2018 dans un système de bio façade (Projet SYMBIO₂). Le flux total d'irradiation à Saint Nazaire pour une journée typique d'hiver pour un réacteur incliné à 45°C étant de $156\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Pruvost *et al.*, 2011). La régulation de température est assurée avec des échangeurs à plaques et une enceinte simulant les besoins en chauffage d'un bâtiment. Le réacteur est constitué de deux réacteurs de type airlift identiques formant un volume total de 170l. La culture a été réalisée en Fed-batch : la récolte d'un volume de 150l étant effectuée une fois par semaine. La disponibilité de cette biomasse en volume important a permis l'étude des différents paramètres du broyage à billes sur la même biomasse en s'affranchissant de l'effet de l'état physiologique des cellules.

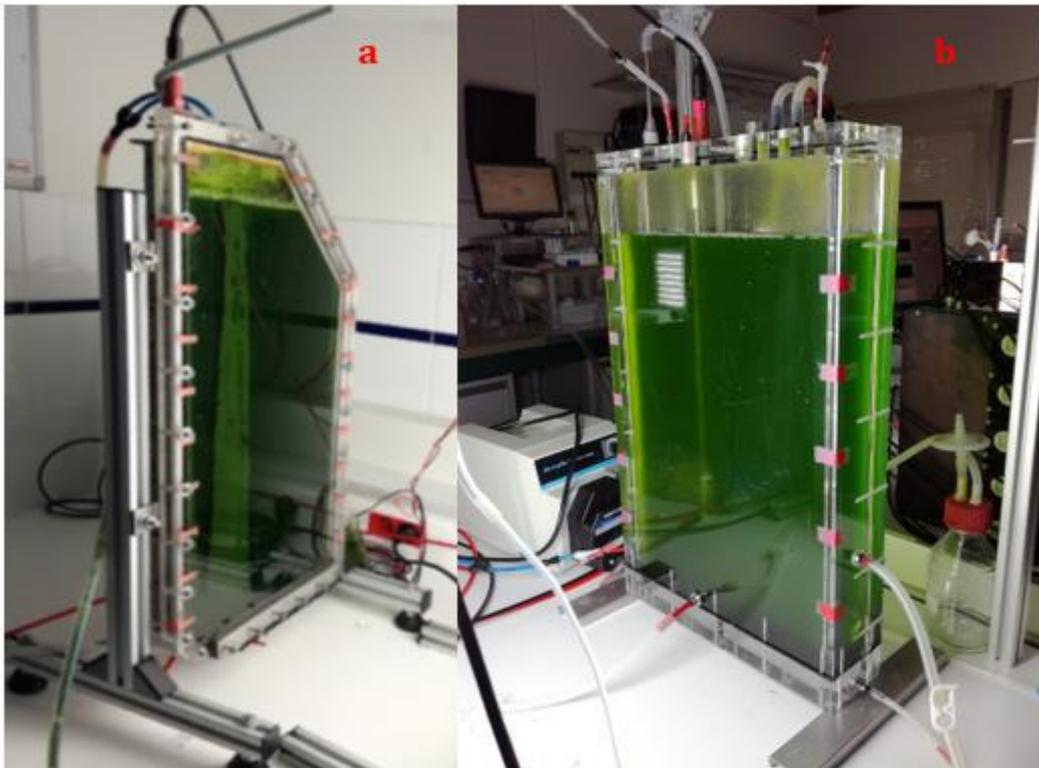


Figure 29 : Photos des systèmes de production : **a** culture de *C. sorokiniana* ; **b** culture de *N. oleoabundans* et *P. kessleri*.

1.5 Suivi des cultures

1.5.1 Mesure de la matière sèche

La croissance des microalgues a été suivie en mesurant la matière sèche. Pour ce faire, un triplicat d'échantillon de 3 à 10 ml de culture est filtré à l'aide d'une pompe à vide à travers un filtre en fibre de verre (Whatman GF/F seuil $0,7\mu\text{m}$) préalablement séché à l'étuve à 105°C pendant 24h. Le filtre contenant la biomasse est ensuite rincé avec de l'eau déminéralisée afin

d'éliminer les sels contenus dans le milieu puis mis à sécher dans une étuve à 105°C pendant 24h. Les filtres secs sont refroidis dans un dessiccateur puis pesés. La matière sèche MS de la culture en $g.l^{-1}$ est alors déduite par la relation de l'équation (23) :

$$MS = 1000 \times \frac{M_f - M_i}{V_{biomasse}} \quad (23)$$

M_f (g) : la masse du filtre sec avec la biomasse

M_i (g) : la masse du filtre sec sans biomasse

$V_{biomasse}$ (ml) : le volume de biomasse filtré

Les cultures sont considérées stables lorsque la mesure de matière sèche sur trois jours successifs est la même à 0,05 g près. La mesure de la matière sèche étant faite après passage de 5 fois le volume du réacteur en mode continu car les réacteurs de type airlift dans les conditions de bullages usuels sont assimilés à des réacteurs parfaitement agités.

1.5.2 Mesure de la fragilité cellulaire par broyage haute pression

1.5.2.1 Description de l'équipement et principe de fonctionnement

Le broyage haute pression a été utilisé pour mesurer la fragilité cellulaire des cultures. En effet, cette méthode de destruction mécanique est simple à mettre en œuvre et implique la variation de peu de paramètres comparativement au broyage à billes : la pression opératoire, la concentration de la suspension et le nombre de passages. Le pilote utilisé est un broyeur TS Series 2,2 kW fabriqué par Constant Systems Limited (Northants, UK). La chambre de compression a un volume de 10 ml. Le fonctionnement du broyeur est basé sur un système hydraulique qui entraîne le piston de haut en bas (Figure 30). Lorsque le piston se déplace vers le bas, la chambre de compression est remplie de suspension. A la remontée du piston, la suspension est compressée à la pression de consigne et forcée à travers la valve et forme un jet dirigé vers une cible. Les mécanismes possibles causant la lyse cellulaire sont selon (Yusaf and Al-Juboori, 2014) :

- Les tourbillons de haute énergie créés lors de la compression et l'écoulement turbulent
- La cavitation due à la réduction de section au passage dans l'orifice de la valve
- L'impact lorsque le jet atteint la cible

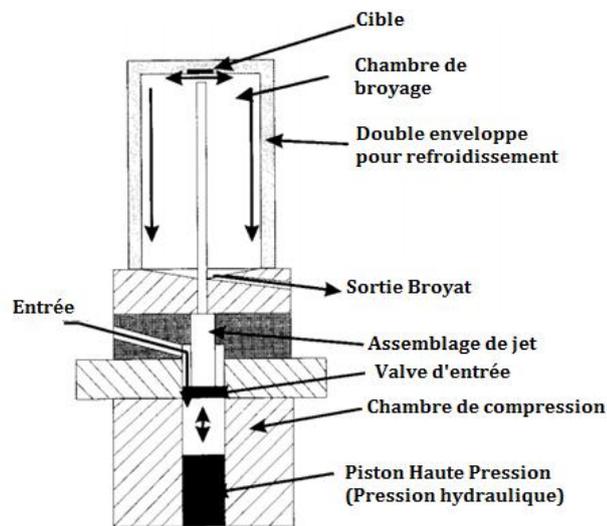


Figure 30 : Principe de fonctionnement du Broyeur Haute Pression (Yusaf and Al-Juboori, 2014)

1.5.2.2 Mise en œuvre du broyage haute pression (BHP)

Pour chaque mesure de fragilité, à une pression donnée, 50 ml de suspension sont utilisés. L'équipement permet de soumettre les cellules à des pressions de 300 à 2700 bars. Le BHP fonctionnant par jets de 10 ml, les deux premiers jets sont écartés afin de s'assurer de la mise en régime de l'équipement et de l'évacuation des liquides de nettoyage et les trois derniers prélevés constituant un triplicat pour analyse. Le taux de destruction est déterminé pour chaque pression de travail par la relation :

$$\eta(P_i) = 1 - \frac{C(P_i)}{C_0} \quad (24)$$

$\eta(P_i)$ désigne le taux de destruction à la pression P_i ,

$C(P_i)$: le nombre de cellules intactes par ml après broyage à la pression P_i ,

C_0 : le nombre initial de cellules par ml.

Le nombre de cellules intactes est déterminé par microscopie couplée à l'analyse d'images (Voir paragraphe 3.1)

2. Broyage à billes

2.1 Description des équipements

2.1.1 Broyeur de l'échelle laboratoire

Le broyeur à billes utilisé pour cette étude est un DYNOMILL MULTI LAB fabriqué par Willy A. Bachofen AG (Muttens, Suisse). Le broyeur est constitué d'une chambre de broyage de 600 ml munie d'une double enveloppe permettant la régulation thermique. A l'intérieur un arbre

est muni de 4 disques d'agitation qui transmettent l'énergie mécanique de l'arbre aux billes. La vitesse d'agitation est réglée en déplaçant une courroie posée sur deux poulies pouvant occuper 3 positions correspondant aux vitesses périphériques des disques d'agitation de : 8 m.s^{-1} , 10 m.s^{-1} et 14 m.s^{-1} (Figure 31).

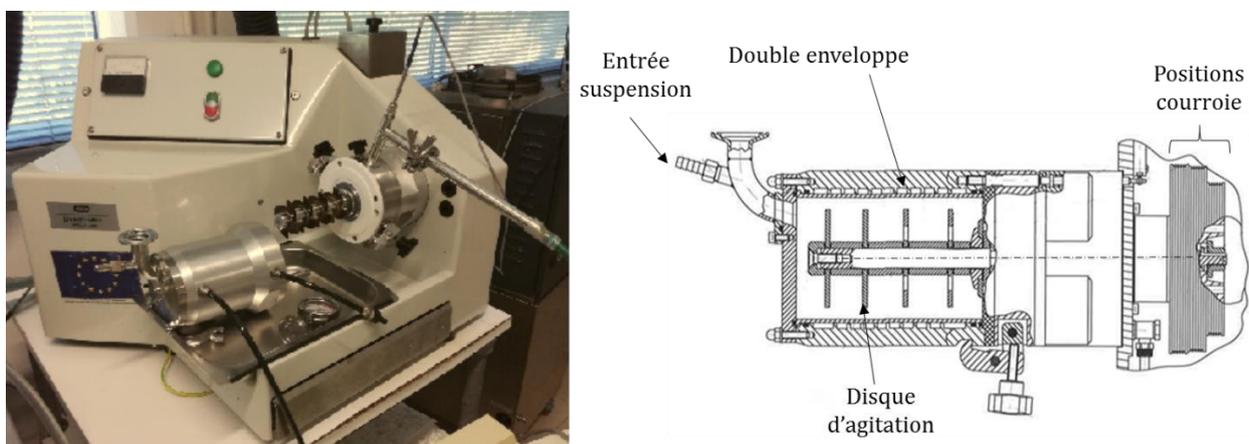


Figure 31 : Schéma du broyeur à billes d'étude

2.1.2 Caractéristiques des billes utilisées

Les caractéristiques des billes utilisées sont résumées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Caractéristiques des billes utilisées dans l'étude avec d_B le diamètre moyen des billes

Matériau	Taille (mm)	d_B (mm)	Densité (kg.m^{-3})	Fournisseur
Zirconium	0,2	0,200	6000	WAB
Verre	0,25-0,5	0,375	2500	Netzsch
Verre	0,5	0,500	2500	WAB
Verre	0,5-0,75	0,625	2500	WAB
Verre	0,8-1	0,900	2500	WAB
Verre	1,2-1,4	1,300	2500	WAB

2.2 Mise en œuvre du broyage à billes

La mise en œuvre du broyage à billes nécessite le choix de multiples paramètres opératoires :

- La formulation de la suspension à traiter : pour le cas des microalgues la souche et la concentration en matière sèche
- La nature des billes (zirconium ou verre), leur taille (0,2 mm – 2,0 mm)

- Le taux de remplissage de la chambre en billes
- La vitesse d'agitation (8 m.s^{-1} ; 10 m.s^{-1} ou 14 m.s^{-1})
- Le mode opératoire (batch, continu, circuit, pendule ou recirculation)

Le mode opératoire du broyeur à billes a un impact sur la distribution des temps de séjour dans le broyeur (Kwade and Schwedes, 2007). Dans cette étude, le broyage a été opéré en mode pendule : la biomasse est traitée en 3 à 5 passages successifs en continu afin d'atteindre des taux de destruction élevés et de déterminer la cinétique de broyage. Selon l'étude hydrodynamique du broyeur, le procédé se stabilise après le passage de 3 à 4 fois le volume de vide dans la chambre de broyage (Montalescot et al., 2015a). Ainsi, pour chaque passage, un échantillon est prélevé en régime permanent (température et pression constantes, après passage de 4 volumes).

Des billes de verres de tailles allant de 0,35 mm à 1,3 mm ont été utilisées. Le taux de remplissage a été fixé à 80 % étant donné que les valeurs recommandées pour améliorer l'efficacité du broyage sont entre 70 % et 90 % : à des taux de remplissage bas (40 %) les billes se tassent vers le bas et les fréquences de collisions sont moins importantes. Par contre, en augmentant les taux de remplissages, les vitesses moyennes des billes sont plus élevées et les fréquences de collisions augmentent jusqu'à ce que l'on atteigne un taux de remplissage limite ne permettant plus des degrés de liberté de mouvement des billes suffisants (Jayasundara *et al.*, 2010).

3. Analyse et caractérisation de la destruction cellulaire

3.1 Méthode de comptage et d'analyse de taille

Afin d'inclure l'effet de la taille des microalgues dans la modélisation de l'opération de broyage à billes une méthodologie d'analyse de taille et de comptage des cellules intactes avant et après broyage a été développée. Le couplage de l'utilisation d'un hématimètre avec l'analyse d'images prises à partir d'un microscope optique a permis d'obtenir simultanément le nombre de cellules et la distribution de taille des cellules.

3.1.1 Préparation des échantillons :

On ajoute 20 μl de Lugol par ml d'échantillon (suspension de cellules intactes ou de broyat) pour permettre d'accélérer la décantation des cellules et de leur donner une couleur foncée améliorant ainsi le contraste sur les photos. Selon la concentration des suspensions, une dilution préalable peut être nécessaire afin d'éviter d'avoir des cellules adjacentes sur les photos (4 fois pour 1 g.l^{-1} de *C. vulgaris* utilisé et 10 fois pour 1 g.l^{-1} *N. oceanica*).

L'hématimètre est une cellule de Malassez. Elle est constituée d'une lame dans laquelle est creusée une chambre de volume connu. La lamelle est posée en la faisant adhérer aux plateaux surélevés humectés en exerçant une pression et un mouvement de va et vient

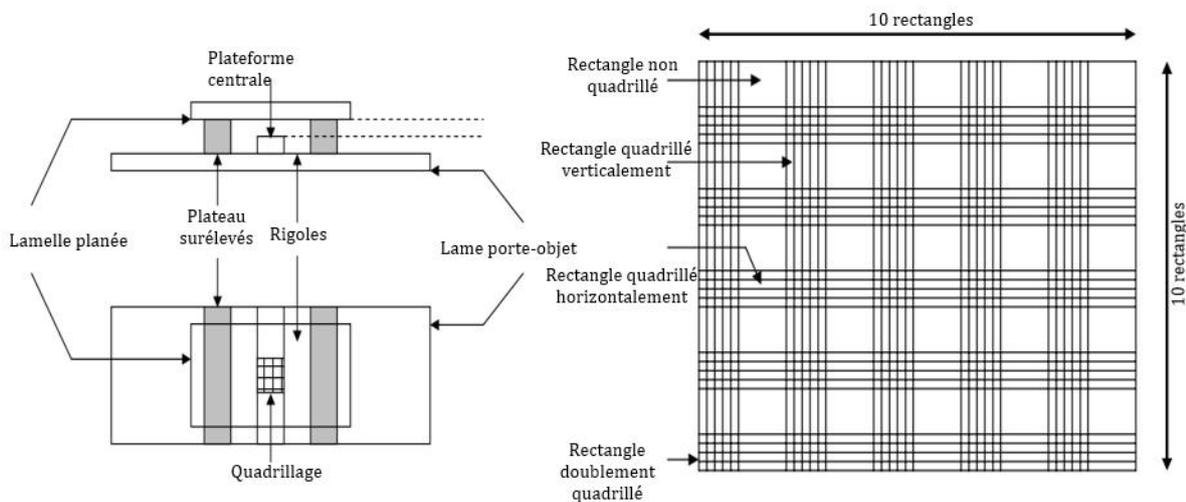


Figure 32 : Description d'une cellule de Malassez

Le remplissage de la chambre avec la suspension se fait alors en une seule fois sans bulle d'air en évitant de déborder dans les rigoles.

La zone quadrillée de la cellule de Malassez comporte 100 rectangles (Figure 32) et a une profondeur uniforme de 0,2 mm.

Dans le souci d'avoir une bonne représentativité des cellules comptées, pour chaque échantillon, un duplicat de photos (2×25 photos) sont prises dans la zone quadrillée de la cellule de Malassez à l'aide d'un microscope optique Carl Zeiss (Axio Scope A1) équipé d'une caméra (Axio Cam MRC) et du logiciel de visualisation Axiovision (Rel 4.8). Les échantillons sont observés avec l'objectif × 40 permettant un grossissement total de 400. La profondeur de champ et les paramètres de luminosité sont maintenus identiques pour chaque échantillon.

3.1.2 Analyse d'images

Les 50 images obtenues par échantillon sont traitées simultanément à l'aide du logiciel Image J (1.50b, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA).

3.1.2.1 Analyse standard

Image J permet de traiter simultanément une séquence d'images. Les étapes générales du traitement sont :

- L'ouverture de la séquence d'images
- La calibration des images : détermination de la correspondance pixels et distance réelle. Pour cela mesure la distance en pixels d'un côté de rectangle de la cellule de Malassez sur

Image J et on la rapporte à sa dimension réelle qui est connue. Ainsi au grossissement utilisé au microscope on observe sur chaque image un seul rectangle doublement quadrillé et le ratio était de 4 pixels. μm^{-1} . La profondeur étant uniforme sur toute la zone quadrillée (0,2 mm) cela a permis d'établir un volume correspondant à chaque image.

Chaque image a un format 1388×1040 pixels correspondant à une aire réelle de 347 $\mu\text{m} \times 260 \mu\text{m}$, ce qui correspond à un volume par image de $1,8 \cdot 10^{-5} \text{ml}$.

- La conversion des images en niveau de gris (vers un format 8 bits)
- Le seuillage de l'image : il consiste à diviser les pixels de l'image en deux groupes : les pixels d'intensités inférieures à la valeur seuil prennent la valeur 0 correspondant à la couleur de fond (blanche) et les autres pixels d'intensités supérieures à la valeur seuil prennent la valeur 255 correspondant à la couleur des objets à détecter (noire). Des méthodes de seuillage automatique sont incluses dans Image J. Dans cette étude la méthode de seuillage globale « Intermodos » a permis d'obtenir les meilleures qualités de seuillage.
- L'analyse de particules : l'analyseur d'image J permet de détecter des particules selon leur aire de projection et leur circularité. Il est donc possible de fixer un intervalle de taille et de forme des particules à détecter. Concernant la taille, le critère utilisé dans toute cette étude est le diamètre équivalent circulaire D_{eqpc} défini dans l'équation (25)

$$D_{eqpc} = 2 \times \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (25)$$

Le critère de forme utilisé est la circularité $Circ$ définie selon l'équation (26):

$$Circ = \frac{4\pi A}{p^2} \quad (26)$$

A : l'aire de projection d'une cellule,

p : le périmètre de l'aire de projection d'une sphère équivalente

Les valeurs de circularité vont de 0 pour les particules très peu sphériques à 1 pour des particules parfaitement sphériques.

Ainsi pour chaque souche une étude préliminaire des caractéristiques en taille et forme de la souche est réalisée afin de fixer les valeurs seuil de circularité et d'aire de projection.

Les populations de microalgues sont divisées en classes de tailles de 0,5 μm et classes de circularité de 0,01. Par exemple, les distributions de taille et de forme de *Chlorella sorokiniana* sont présentées en Figure 33 et Figure 34 .

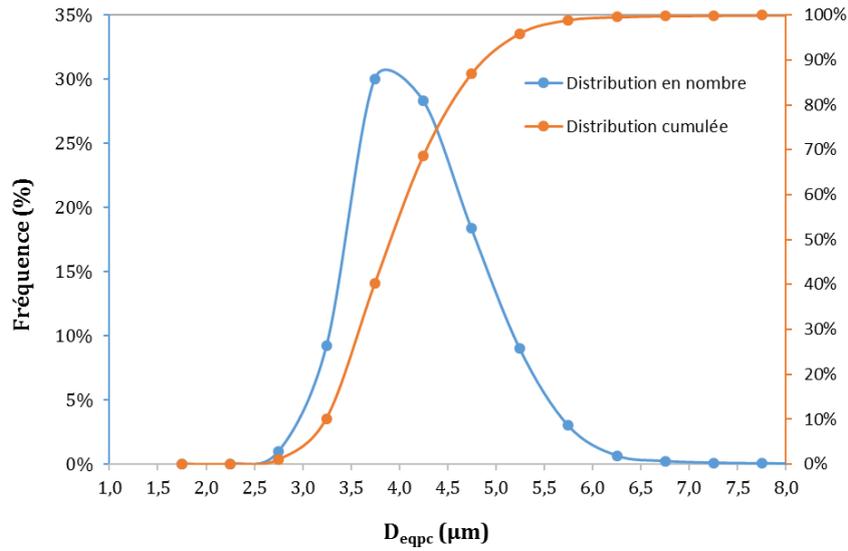


Figure 33 : Distribution de taille de la culture de *Chlorella sorokiniana* en régime permanent

Les cellules de *Chlorella sorokiniana* ont dans les conditions de culture un D_{eqpc} compris entre $2 \mu m$ et $6,5 \mu m$ avec une moyenne de $4,3 \mu m$ et un écart-type de $0,7 \mu m$. Cela a permis de définir comme seuil de taille pour l'analyse de forme $5 \mu m^2$ - $80 \mu m^2$. La valeur minimale $5 \mu m^2$ correspondant à une D_{eqpc} de $2,5 \mu m$ choisie a été un compromis entre la prise en compte de toutes les cellules et l'exclusion des débris cellulaires dans l'analyse du broyat (Figure 35). Les seuils de taille ont été déterminés également pour les autres souches (Tableau 14)

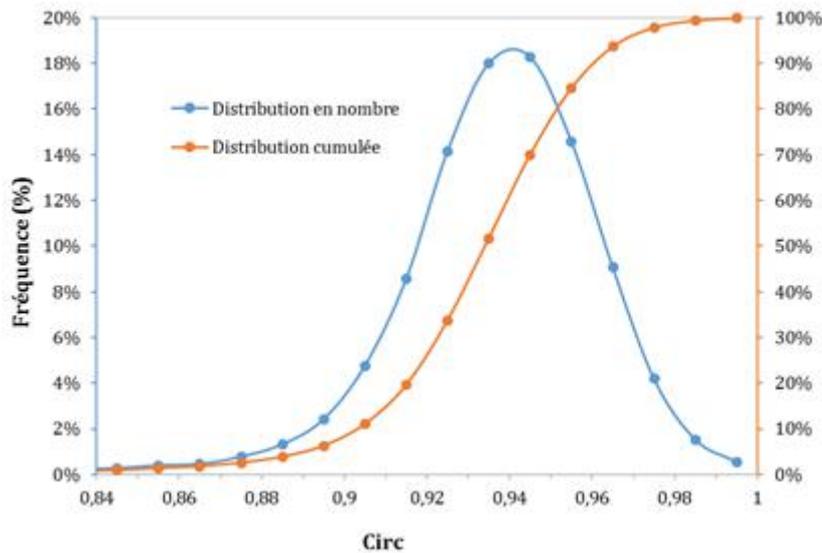


Figure 34 : Distribution de forme de la culture de *Chlorella sorokiniana* en régime permanent

L'étude de la forme des cellules (Figure 34) à travers la circularité a montré que la circularité moyenne est $0,94$ avec un écart type de $0,02 \mu m$. La valeur de filtre retenue pour les

analyses était 0,85. Cette valeur permet de discriminer lors de la détection des particules les débris cellulaires et cellules déformées. De plus, avec la distribution cumulée, il a été vérifié qu'en imposant une circularité supérieure à 0,85 une très faible proportion des cellules (1,3%) ne sont pas prises en compte.

Tableau 14 : Caractéristiques des distributions de taille et de forme des différentes souches étudiées (FJ : fin du régime lumière et FN : fin du régime obscurité)

	<i>P. kessleri</i>	<i>C. sorokiniana</i>	<i>N. oleoabundans</i>	<i>C. vulgaris</i>	<i>N. oceanica</i>
Nombre de Cellules	21221	50696	6762 (FJ)- 26761(FN)	42107	22035
Aire _{min} (µm ²)	5	5	4	4	2
Aire _{max} (µm ²)	130	80	80	50	20
\bar{D}_{eqpc} (µm)	5,2	4,2	5,5(FJ)-3,7(FN)	3,4	2,6
Ecart-type relatif D_{eqpc} (%)	23 %	15%	16 %(FJ)-15%(FN)	17 %	11%
Circularité moyenne	0,94	0,94	0,94(FJ)-0,95(FN)	0,96	0,98
Ecart-type relatif Circularité (%)	3 %	2 %	3 %	3 %	2 %

Par ailleurs, pour vérifier que le traitement d'image est satisfaisant, en particulier pour les broyats, pour 5 images un comptage manuel est systématiquement réalisé et comparé aux résultats de l'analyseur de particules d'Image J. L'écart relatif moyen $\overline{\Delta E}$ défini dans l'équation (27) est jugé satisfaisant s'il est inférieur à 10 %.

$$\overline{\Delta E} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n \frac{|N_k - N_{k\text{manuel}}|}{N_{k\text{manuel}}} \quad (27)$$

$\overline{\Delta E}$: écart relatif moyen sur les images

n : le nombre d'image comptées manuellement

N_k , respectivement $N_{k\text{manuel}}$ le nombre de cellules comptées par Image J et manuellement pour la photo k .

Si le critère n'est pas vérifié, la valeur de seuillage automatique est corrigée manuellement.

Lorsque le traitement d'images est jugé satisfaisant, le taux de destruction après j passages au broyeur peut être déduit pour chaque classe de taille i , $\eta_j(i)$ et pour la population η_j globale par les équations :

$$\eta_j = 1 - \left(\frac{C}{C_0}\right)_j \quad (28)$$

$$\eta_j(i) = 1 - \left(\frac{C(i)}{C_0(i)}\right)_j \quad (29)$$

Avec C (respectivement $C(i)$) les concentrations cellulaires (nombre de cellules par unité de volume) globale et de la classe de taille i à la sortie du broyeur,

C_0 et $C_0(i)$ les concentrations en nombre de cellules des suspensions avant broyage.

3.1.2.2 Cas particuliers d'analyse d'image

Avant l'analyse de particules, on peut améliorer le traitement en utilisant des fonctions permettant de combler des contours creux (« Process→Binary→Fill holes »), de séparer des particules qui se chevauchent (« Process→Binary→Watershed »), ou encore d'enlever du bruit (« Process→Noise→Despeckle »)

Pour certains échantillons, particulièrement ceux pour lesquels le niveau de broyage est élevé (>80 %) les débris créent un bruit de fond important et les contours des cellules sont moins bien définis. Dans ces cas, l'outil de seuillage d'images en couleur (échelles RGB) a été utilisé comme prétraitement pour améliorer la qualité du traitement.

D'autre part, des méthodes automatiques de seuillage local existant dans la version plus récente d'Image J (Image J 2.0.0-rc-65) permettent de traiter chaque image avec un seuillage local appliqué à un rayon fixe de l'image. Les méthodes de Sauvola (Sauvola and Pietikäinen, 2000) et de Phansalkar (Neerad Phansalkar *et al.*, 2011) sont celles qui ont permis d'avoir de meilleurs résultats.

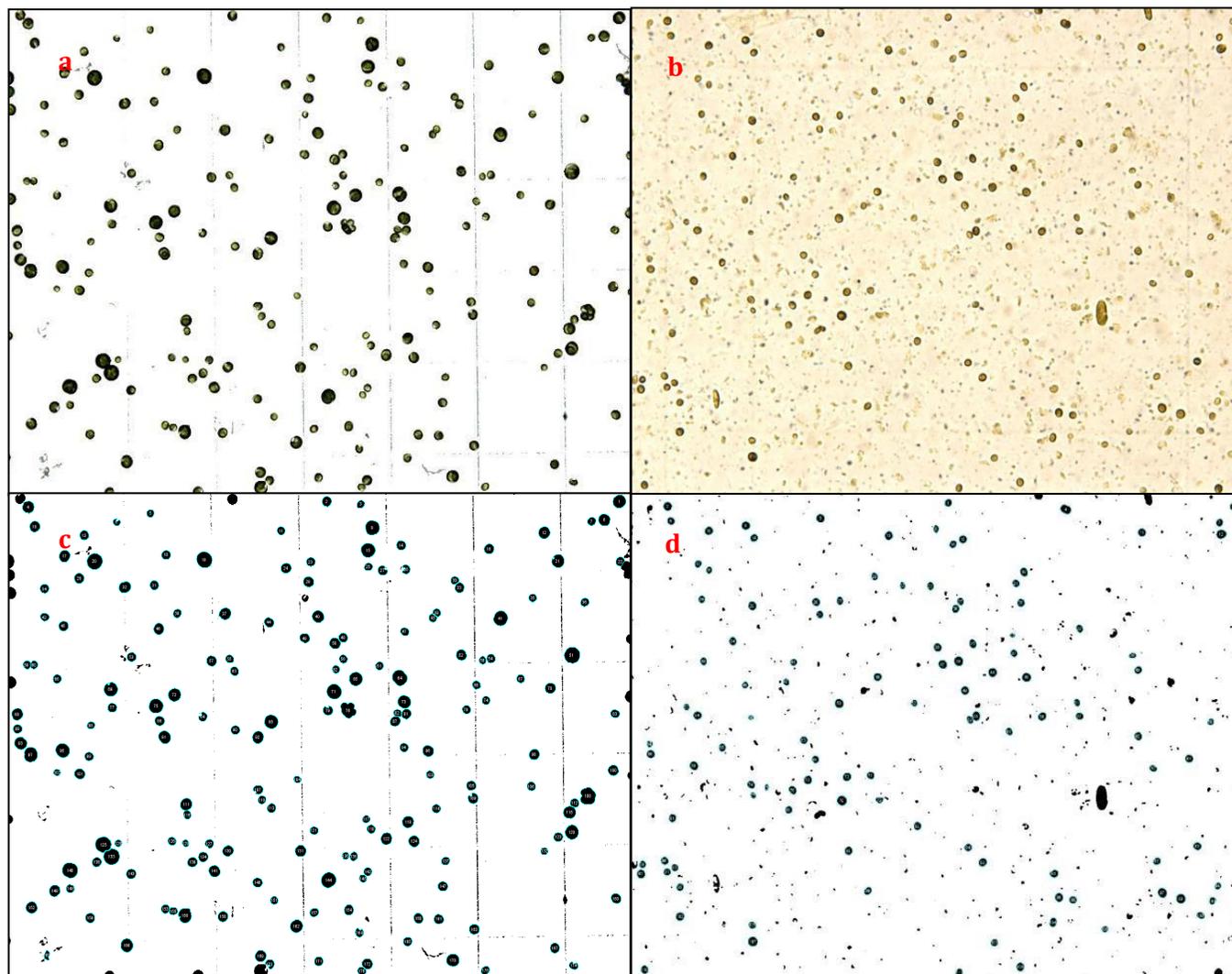


Figure 35 : Exemples de traitement d'images : **a** et **c** images d'un échantillon de culture *P. kessleri* avant et après traitement d'images ; **b** et **d** images d'un échantillon de broyat de *C. sorokiniana* avant et après traitement d'images

3.1.2.3 Validation de la méthode de comptage et d'analyse de taille

Le nombre de cellules intactes comptées par échantillons doit être suffisant afin de mieux représenter la population globale. Pour l'estimation du diamètre D_{eqpc} moyen de la population on peut déterminer le nombre minimal de cellules à compter pour une erreur maximale donnée sur le diamètre moyen ε_{max} avec un niveau de confiance donné par la relation de l'équation(30).

$$N_{min} = \left(\frac{t \cdot \sigma}{\varepsilon_{max}}\right)^2 \quad (30)$$

Où t est donné par la loi de student en fonction du degré de liberté et du niveau de confiance σ : l'écart-type estimé de la distribution de taille.

Le niveau de confiance souhaité permet de choisir le coefficient t donné par la loi de student. Pour un degré de liberté infini (>200) le coefficient t vaut 1,96 pour un niveau de confiance de 0,95. En utilisant cette valeur optimiste de t par exemple pour la population de *C. sorokiniana* (Tableau 14) on trouve que pour avoir un écart maximum de 1 % par rapport au D_{eqpc} moyen (4,2 μm) il faut compter au moins 905 cellules pour avoir un niveau de confiance à 0,95.

Par ailleurs, plus on veut de précision dans la distribution de taille (petites classes), plus il faut compter de cellules. Pour trancher sur le nombre de cellules pour avoir distribution représentative avec des classes de tailles de 0,5 μm l'effet du nombre de cellules sur la forme de la distribution pour le cas de la population de *C. sorokiniana* est présentée en Figure 36. On constate que les distributions sont superposées à partir de 5000 cellules.

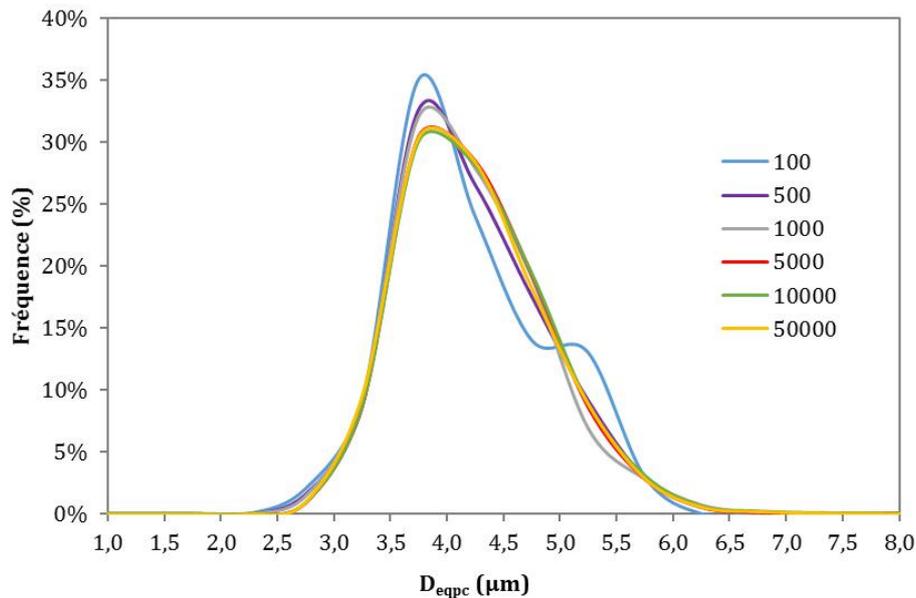


Figure 36 : Effet du nombre de cellules sur la distribution de taille de *C. sorokiniana*

En définitive pour toutes les distributions de taille des cultures étudiées au moins 5000 cellules ont été prises en compte.

3.2 Analyses biochimiques du broyat

La quantification des protéines solubles et de la chlorophylle a libérées a été faite pour les broyages de *C. sorokiniana* et de *P. kessleri* afin d'évaluer le niveau de destruction et leur libération sélective au cours du broyage. Les protéines solubles qui sont majoritairement cytoplasmiques ont été choisies comme indicateur de la rupture de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique. La libération de la chlorophylle a localisée dans les chloroplastes quant à elle caractérise la rupture d'organites intracellulaires et est donc indicatrice d'un niveau de destruction plus avancé.

3.2.1 *Analyse des protéines solubles*

Le broyat est centrifugé dans des tubes eppendorf de 2 ml puis centrifugés à 12 045 g pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse (Mini spin, Eppendorf). La fraction des protéines solubilisées lors du broyage est dosée par la méthode BCA (Smith *et al.*, 1985). Il s'agit d'une méthode colorimétrique permettant de quantifier les protéines totales. Elle est basée sur la réaction de biuret (réduction du cuivre Cu^{2+} en Cu^{1+} en milieu alcalin) et la détectabilité de l'ion Cu^{1+} grâce à sa couleur pourpre. Le réactif utilisé pour la réduction du cuivre est l'acide bicinchoninique. Le protocole utilisé se résume dans les étapes suivantes :

- On prépare une solution test composée d'un rapport volumique de 1:50 (v/v) du réactif B avec le réactif A du kit (Pierce™ BCA™ Thermo Fischer Scientific).
- On prépare une gamme étalon de 0 à 0,5 g.l⁻¹ de protéine standard BSA (Bovine Serum Albumin).
- Dans des tubes eppendorf, on mélange au vortex pendant 5 s, 1 ml de solution test et 500 µl d'échantillons à analyser ou de solution standard diluée. Un triplicat est fait pour chaque échantillon à analyser.
- Les tubes eppendorf contenant le mélange solution test et échantillons protéinés sont incubés pendant 30 minutes dans un bain marie à 37°C
- Les tubes sont ensuite refroidis et la lecture de l'absorbance à 562 nm est faite à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (V-630 Jasco, Deutschland).

Une droite d'étalonnage obtenue avec les différentes dilutions de standard permet de déduire de l'absorbance à 562 nm des échantillons leurs concentrations en protéines en équivalent BSA.

Le taux de libération des protéines solubles est calculé pour chaque passage de broyage à billes en utilisant comme référence la quantité totale de protéines contenue dans les cellules. Les protéines totales sont dosées avec le surnageant de broyats obtenus par broyage haute pression à 2 700 bar par la même procédure que l'analyse des protéines solubles.

$$\eta_{p i} = 100 \times \frac{C_{p i}}{C_{p 2700b}} \quad (31)$$

$\eta_{p i}$ (%): taux de libération des protéines solubles après i passages

$C_{p i}$ (g.l⁻¹) : concentration en protéines solubles dans le surnageant après i passages

$C_{p 2700b}$ (g.l⁻¹) : concentration en protéines solubles dans le surnageant après broyage haute pression à 2700 bar.

3.2.2 Analyse des pigments

La quantification de la chlorophylle a est faite par extraction au méthanol selon le protocole de Kandilian *et al.*(2016) sur le culot du broyat ou de cellules intactes. En fonction de la concentration en matière des échantillons, 0,5 à 1 ml de suspension sont centrifugés dans des tubes eppendorf à 12 045 g pendant 15 min. Le surnageant est retiré, puis 1,5 ml de méthanol sont mélangés au culot par vortex pendant 15 secondes. L'ensemble est incubé à l'obscurité dans une étuve à 44°C pendant 45 min. Après refroidissement, les tubes sont à nouveau centrifugés à 12 045 g pendant 15 min et la lecture des absorbances des surnageants est faite à 652 nm et 665 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (V-630 Jasco, Deutschland).

La concentration en chlorophylle a dans l'extrait du culot est calculée selon l'expression établie par (Ritchie, 2006) :

$$C_{chl a,i} = (-8,0962 \times Abs_{652}) + 16,5169 \times Abs_{665} \quad (32)$$

$C_{chl a,i}$ (µg.ml⁻¹) étant la concentration en chlorophylle a de l'extrait du culot de broyat après i passages.

Abs_{652} et Abs_{665} les absorbances respectivement à 652 nm et 665 nm corrigées par l'absorbance à 750 nm.

La fraction de pigments libérés par broyage est alors calculée par différence entre le culot intact et le culot des différents broyats et le taux de libération de la chlorophylle a après i passages $\eta_{chl a,i}$ est exprimé selon l'équation (33):

$$\eta_{chl a,i} = 100 \times \left(1 - \frac{C_{chl a,i}}{C_{chl a,0}}\right) \quad (33)$$

$C_{chl a,0}$ désigne la concentration totale en chlorophylle a obtenue du culot des cellules intactes.

4. Etude de la distribution des temps de séjour

Lorsqu'on travaille en opération continue, le temps de séjour des cellules dans le broyeur est important pour la détermination de la cinétique de destruction. En effet, plus le temps de séjour est élevé, plus les cellules ont une grande probabilité d'être soumises à des évènements stressants qui permettront leur lyse.

4.1 Généralités sur la distribution des temps de séjour

La notion de temps de séjour a été introduite en 1953 par Danckwerts qui a proposé une approche systémique pour décrire le comportement hydrodynamique des écoulements dans les réacteurs. Lorsqu'une particule de fluide entre dans un système, on définit le temps de séjour de cette particule comme étant le temps écoulé entre son entrée et sa sortie du système. La fonction distribution des temps de séjour $E(t_s)$ est définie de telle sorte que la fraction de fluide ayant un temps de séjour compris entre t_s et $t_s + dt_s$ soit égale au produit $E(t_s).dt_s$. La fonction $E(t_s)$ étant une distribution d'une loi de probabilité, elle vérifie l'équation (34).

$$\int_0^{\infty} E(t_s).dt_s = 1 \quad (34)$$

On peut définir les moments d'ordre n de la distribution par

$$\mu_n = \int_0^{\infty} t_s^n E(t_s).dt_s \quad (35)$$

Le moment d'ordre 1 μ_1 correspond au temps de séjour moyen \bar{t}_s

Le moment d'ordre 2 centré σ^2 correspond à la variance de la distribution et caractérise la dispersion autour de la moyenne.

$$\sigma^2 = \mu_2 - \mu_1^2 = \int_0^{\infty} (t_s - \bar{t}_s)^2 E(t_s).dt_s \quad (36)$$

Il existe deux cas idéaux d'écoulements :

- Les réacteurs parfaitement agités (RPA) :

Pour ce type de réacteurs, le mélange est parfaitement homogène et toutes les particules fluides présentes dans le réacteur à un instant donné ont la même probabilité de sortir du réacteur. La concentration dans le réacteur est égale à celle en sortie du réacteur.

- Les réacteurs piston (RP)

Pour ce type de réacteur, il n'y a aucune dispersion axiale. Tous les éléments du fluide suivent le mouvement convectif et ont le même temps de séjour correspondant au temps de passage du réacteur.

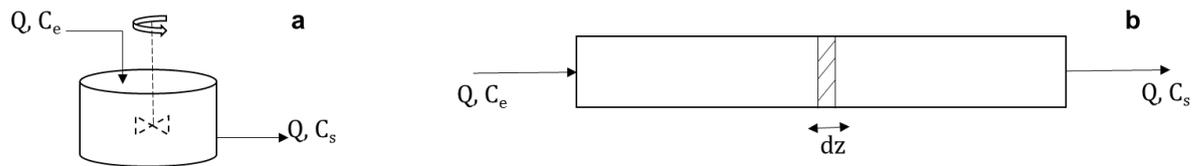


Figure 37 : Schéma des Réacteurs idéaux RPA (a) et RP (b)

En réalité, les systèmes ont des écoulements plus complexes. Les écarts par rapport aux réacteurs idéaux (Figure 38) peuvent être dus à :

- Des courts-circuits (1)
- Des écoulements préférentiels (2)
- Une recirculation dans le réacteur (3)
- La présence de zones mortes (4)

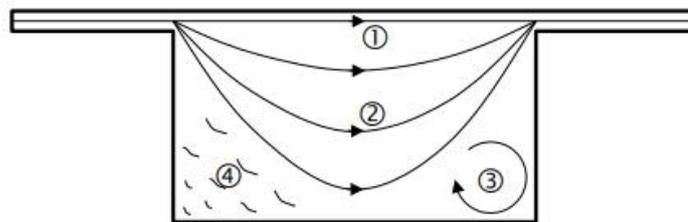


Figure 38 : Exemples d'écarts par rapport aux écoulements idéaux

4.2 Protocole expérimental

Pour la détermination expérimentale de la DTS, la méthode du traceur a été utilisée. Le traceur doit être choisi de telle sorte qu'il ne perturbe pas l'écoulement du fluide porteur. Une solution saline de chlorure de sodium a été utilisée dans notre cas et une sonde de conductimétrie (TACUSSEL, type CD 810) a été placée en sortie du broyeur avec une acquisition en ligne.

Un étalonnage entre concentration en sel et conductivité doit être établi au préalable afin de s'assurer que durant la mesure, les conductivités restent dans une zone linéaire (en rouge Figure 39) de la sonde et la quantité de sel à injecter est choisie en conséquence.

Le signal d'entrée appliqué est sous forme d'impulsion : la durée d'injection doit être inférieure à 1 % du temps de passage dans le broyeur. L'injection d'environ 5 ml de solution de NaCl à 200 g.l⁻¹ est faite à l'aide d'une seringue et le signal est enregistré jusqu'à atteindre la valeur avant injection.

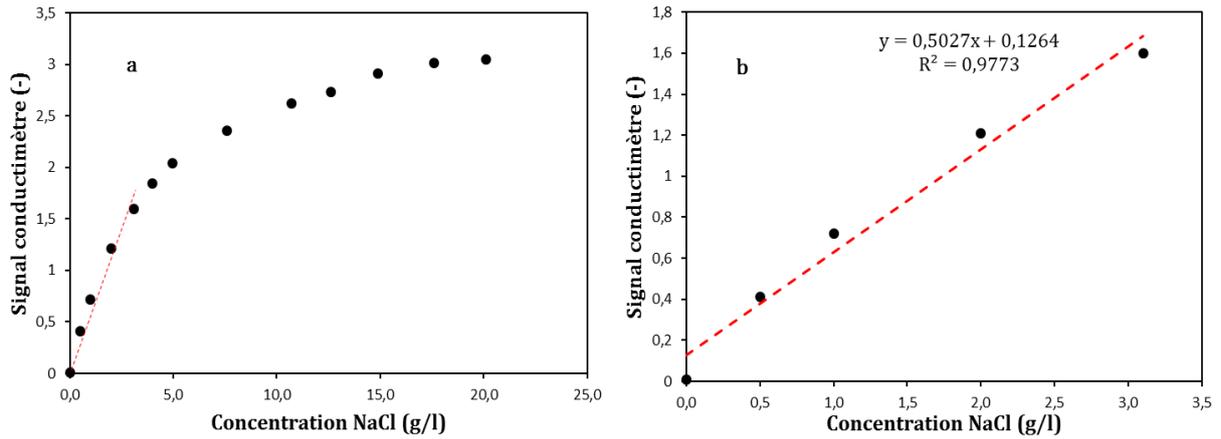


Figure 39 : Etalonnage du conductimètre : **a** courbe globale ; **b** détail sur la zone linéaire

4.3 Analyse des résultats

Le signal de sortie est enregistré avec un pas de temps Δt_s de 1 s et la DTS expérimentale est directement obtenue par normalisation du signal de sortie.

$$C_{norm}(t_{s,i}) = \frac{C(t_{s,i}) - C(0)}{\sum_{i=1}^n C(t_{s,i}) \cdot \Delta t_s} \quad (37)$$

$C(0)$: la valeur initiale du signal

$C(t_{s,i})$: la valeur du signal enregistrée par le conductimètre au temps de séjour de pas i

n (s) : le temps écoulé jusqu'à obtention de la valeur initiale du conductimètre

La distribution expérimentale est tracée en fonction d'un temps réduit adimensionnel $t_{r,i}$: $E_{exp}(t_{r,i})$ afin de comparer plusieurs expériences avec des temps de passage différents.

$$E_{exp}(t_{r,i}) = C_{norm}(t_{r,i}) \cdot \tau \text{ avec } t_{r,i} = \frac{t_{s,i}}{\tau} \quad (38)$$

Avec $\tau(s) = \frac{V}{Q}$, V le volume de vide dans le broyeur

Dans l'équation (39) on multiplie par τ pour normaliser $E_{exp}(t_r)$ et donc vérifier $\int_0^\infty E_{exp}(t_r) dt_r = 1$.

On applique le même changement de variable et la normalisation au modèle de cascade de RPA décrit dans l'équation (55) et on obtient :

$$E(t_r) = \left(\frac{j}{\tau}\right)^j \frac{(\tau \cdot t_r)^{j-1} \exp(-j t_r)}{(j-1)!} \cdot \tau \quad (39)$$

Le nombre j de réacteurs en cascade du modèle correspondant à la DTS expérimentale est déterminé par itération sur j en minimisant l'erreur quadratique $\Delta E^2(t_r)$ calculée selon l'équation (40) entre $E(t_r)$ et $E_{exp}(t_r)$.

$$\Delta E^2(t_r) = \sum_{i=1}^n [E(t_r) - E_{exp}(t_r)]^2 \quad (40)$$

5. Approche pour l'estimation des incertitudes

Il existe plusieurs méthodes d'estimation des incertitudes. Dans cette, étude les durées d'analyses étant longues et le nombre d'échantillons à analyser par expérience de broyage étant importants (6), les nombres de répétitions par échantillon étaient limités à 2 (comptage cellulaire) ou 3 (mesures de matière sèche, protéines, pigments et de fragilité cellulaire).

Dans le calcul d'incertitude, seule l'incertitude liée à la répétabilité des mesures a été prise en compte. En effet l'incertitude liée à la précision des appareils de mesures (exemple : balance de précision à 0,0001 g près) a été négligée car très faible par rapport à la variabilité de l'échantillonnage. Lorsqu'une grandeur x est mesurée par n échantillons l'incertitude relative de la mesure $\frac{u(x)}{\bar{x}}$ est calculée selon la relation :

$$\frac{u(x)}{\bar{x}} (\%) = k \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \frac{\sigma(x_1, x_2, \dots, x_n)}{\bar{x}} \quad (41)$$

$\sigma(x_1, x_2, \dots, x_n)$ étant l'écart-type standard des n mesures de x

Ainsi par exemple pour le calcul de la matière sèche :

La mesure est faite en triplicat et l'incertitude relative est calculée selon la relation

$$\frac{u(MS)}{MS} (\%) = k \cdot \frac{1}{\sqrt{3}} \frac{\sigma(MS_1, MS_2, MS_3)}{\overline{MS}} \quad (42)$$

$\sigma(MS_1, MS_2, MS_3)$ l'écart-type sur les 3 mesures

\overline{MS} la moyenne des 3 mesures

k le facteur d'élargissement

En toute rigueur, le facteur d'élargissement devrait être calculé selon la loi de probabilité de l'erreur ici inconnue. Une valeur de $k = 2$ a été utilisée correspondant à une densité de probabilité d'une loi normale avec un niveau de confiance de 0,95.

Pour les grandeurs calculées à partir de mesures élémentaires, l'incertitude relative est calculée en combinant les incertitudes de chaque mesure selon les formules générales :

$$si y = x_1 \pm x_2 + \dots + x_n, \text{ alors } u(y) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots + u(x_n)^2} \quad (43)$$

$$si y = x_1^{\pm 1} \cdot x_2^{\pm 1} \dots x_n^{\pm 1}, \text{ alors } \frac{u(y)}{y} = \sqrt{\left[\frac{u(x_1)}{x_1}\right]^2 + \left[\frac{u(x_2)}{x_2}\right]^2 + \dots + \left[\frac{u(x_n)}{x_n}\right]^2} \quad (44)$$

Par exemple pour le taux de destruction à une pression P_i donnée du broyeur haute pression défini selon l'équation (24) :

$$\frac{u[\eta(P_i)]}{\eta(P_i)} (\%) = \sqrt{\frac{u[C(P_i)]^2}{C(P_i)} + \frac{u[C(P_i)]^2}{C(P_i)}} \quad (45)$$

L'incertitude relative des constantes cinétiques globales K de destruction par broyage à billes a été calculée selon la relation :

$$\frac{u(K)}{K} (\%) = \frac{[Max[(K - K_{min}); (K_{max} - K)]]}{K} \quad (46)$$

K_{min} et K_{max} étant les constantes cinétiques minimales et maximales déterminées par la méthode des moindres carrés en utilisant les valeurs minimales et maximales expérimentales des de taux de destruction à chaque passage j .

$$\eta_{j,min} = \eta(i) - u(\eta_j) \text{ et } \eta_{j,max} = \eta_j + u(\eta_j). \quad (47)$$

Chapitre 3 : Effet de la disparité des cellules dans les cultures de micro algues sur la résistance au broyage mécanique

Résumé :

Dans ce chapitre, l'effet de l'âge et/ou la taille des cellules sur leur fragilité au broyage mécanique est étudié. La synchronisation de la division d'une culture de *N. oleoabundans* permet de comparer le comportement au broyage des cellules dans deux états opposés du cycle cellulaire : cellules mères et cellules filles.

Par la suite, la fragilité cellulaire par classe de taille est étudiée pour des cultures de *P. kessleri* et de *C. sorokiniana*. Le broyage haute pression est utilisé comme méthode de pré-caractérisation de la fragilité cellulaire.

Introduction	88
1. Effect of cell life stage on their resistance to bead milling disruption	89
1.1 Introduction	89
1.2 Theoretical background	90
1.3 Materials and methods	91
1.4 Results and discussion.....	94
1.5 Conclusion.....	99
2. Effet de la taille des cellules sur la fragilité cellulaire au broyage haute pression	100
2.1 Broyage haute pression de <i>P. kessleri</i> et <i>C. sorokiniana</i>	100
2.2 Comparaison <i>C. sorokiniana</i> et <i>P. kessleri</i>	102
2.3 Effet de fatigue sur la fragilité au broyage haute pression	102
Conclusion	105

INTRODUCTION

Les cultures de microalgues sont constituées en général de populations de cellules (une ou plusieurs souches) ayant des propriétés : taille, âge et composition biochimique différentes. En effet, les cultures en batch évoluent dans le temps en fonction de la disponibilité des nutriments et ont des cellules dont les propriétés sont dispersées. Les cultures en continu même stables sont constituées de populations cellulaires qui ont des propriétés macroscopiques stables. La synchronisation de la division des microalgues est une méthode qui permet d'obtenir des cellules étant dans la même phase du cycle cellulaire. Même dans les cultures synchronisées, les cellules présentent une disparité en taille, en composition et en nombre de division (Garz *et al.*, 2012). L'étude des effets différenciés de la taille, de l'âge et de la composition des cellules s'avère donc être très complexe car ces trois paramètres sont liés.

Néanmoins dans ce chapitre, la mise en place de la synchronisation d'une culture de *Neochloris oleoabundans* a permis d'étudier l'effet de l'âge des cellules sur la cinétique de broyage à billes. Cette partie sera soumise comme un article de recherche et a été intégrée sous sa forme publiable dans ce chapitre.

Par la suite, l'effet de la taille des cellules sur leur fragilité par broyage haute pression a été étudié pour des cultures non synchronisées de *Chlorella sorokiniana* et *Parachlorella kessleri*. Le broyage haute pression a été choisi à la fois pour comparer ces deux souches, et du fait de sa simplicité de mise en œuvre et des quantités faibles d'échantillons requis.

1. Effect of cell life stage on their resistance to bead milling disruption

1.1 Introduction

The use of microalgal biomass to produce bulk chemicals and biofuels requires improvements in large scale production and downstream processing technologies with integrated production chains. Large scale production is usually achieved in outdoor photobioreactors or open ponds using sun light energy for cost saving. Downstream processing generally includes harvesting, cell disruption, extraction and purification and accounts for more than 50% of the biorefineries production costs. (Molina Grima *et al.*, 2003; Wijffels *et al.*, 2010; Chew *et al.*, 2017; Moreno-Garcia *et al.*, 2017).

Many green algae have high growth rates thanks to their ability to divide by multiple fission. When submitted to light and dark cycles, they can synchronize their division to optimize the use of light energy. The cells grow during the light phases with the accumulation of metabolites (protein, starch and lipids) and undergo DNA replication, mitosis and cell division during dark phases. Microalgae can then divide into 2^n cells where n is an integer between 1 and 10 (Vitova and Zachleder, 2005). The study of the composition of synchronized cultures of *Neochloris oleoabundans* with light/dark cycles revealed that cells have higher contents in protein and storage molecules at the end of the light periods than at the end of the dark periods (de Winter *et al.*, 2013a; Lenneke de Winter *et al.*, 2017). In fact, cells use a part of the accumulated energy during light periods for division during dark periods. Light and dark cycles with artificial light are often used to simulate the natural oscillations of sunlight. Therefore, synchronized cells with light and dark cycles can be used a tool for predicting the variations of cells composition in outdoor cultures.

Since cells are likely to have higher product content at the end of day in outdoor cultures, the study of the disruption behavior of synchronized cultures at different cell cycle stages should provide more information to for example decide when to harvest for an integrated production chain. Indeed, cell disruption is a preliminary step in downstream processing that allows the access to intracellular biomolecules and enhances their extraction yields. Bead milling has been revealed as a promising technology for mild cell disruption for microalgae biorefineries (Postma *et al.*, 2015; Phong *et al.*, 2017). In addition, it allows high disruption efficiency and apparatuses are available at large scale. Therefore, bead milling was used in this study as a reference disruption method to evaluate the effect of cell life stage on cell disruption efficiency. For this purpose, the synchronization of the division of *N. oleoabundans* have been induced by applying light /dark cycles to have a culture with cells in the same life cycle stage. Then, the cells at the end of the growth stage (end of light period) and at the end of division (end of dark period) were processed with identical bead milling conditions. Protein and chlorophyll a release during bead milling were also analyzed for both life cycle stages.

1.2 Theoretical background

Cell life cycle is commonly defined as the succession of a growth phase (G1), a synthesis phase (S) (DNA replication), a second growth phase (G2), mitosis (M) (nuclear division) and cell division also named cytokinesis (C). However, for green algae dividing by multiple fission, some of these phases may overlap. These organisms can divide into 2^n (where n is an integer from 1 to 10) cells depending on the growth conditions. For a better understanding of the mechanism of division by multiple fission, cell life cycle was considered as a succession of two coordinated processes: the growth phase (G1) and the 'DNA replication-division sequence' including S, G2, M and C phases (Bisova and Zachleder, 2014). The number of daughter cells is determined by the number of DNA replication-division sequences occurred in the mother cell. During the light-dependent growth phase G1, cells increase their volume until they double it. At this specific moment, named 'commitment point' (CP), cells can divide when incubated immediately in dark. The number of CP that cells can reach depends on external conditions and mainly on light and temperature. When conditions are favorable for a fast growth, cells that attained a CP and started DNA replication start simultaneously a new growth phase until the volume is doubled again. A second CP point is attained and therefore a new DNA replication is started. Then, cells "decide" whether they start another growth phase or divide into four cells. The mechanism that helps cell to make the decision between starting a new growth phase or dividing is not fully understood. The action of a "commitment timer" or an endogenous "circadian clock" that determines the start of division events and the length of the post-commitment period was discussed due to the persistence of synchrony when cells are submitted to continuous light. The control of the number of divisions by mother cell size has also been assumed (CRAIGIE and CAVALIER-SMITH, 1982; Donnan and John, 1983; DONNAN *et al.*, 1985). More recent studies were in contradiction with the action of a timer but indicated an effect of the cells growth rate and a critical volume that triggers the division events. It was pointed out that not all the mother cells that starts a new growth phase can reach the following CP: the cells which don't reach the following CP divide into bigger daughter cells than those which reach the following CP (Bisova and Zachleder, 2014; Vitova and Zachleder, 2005).

The synchronization of green algae with light/dark cycles were first attempted by Tamiya and his co-workers (Tamiya *et al.*, 1953) with *Chlorella* cells. Later, several authors used light/dark cycles to synchronize microalgae culture. The general idea was to determine the length of light/dark cycles by trial and errors and to dilute cells at the beginning of the light period to maintain a constant cells density. The dilution mode was either manual or automatized to avoid variability (Peau *et al.*, 1971; Senger *et al.*, 1972). To achieve synchronization, culture conditions should be as optimal as possible to ensure high growth rates and all cells should divide during the dark periods (Senger and Bishop, 1969). Yet, for the use of synchronous

cultures as a model of a single cell, Tamiya and his collaborators (TAMIYA, 1966) recommended to start cultures with homogeneous populations : for example they selected by centrifugation a homogeneous population of young and small cells of *Chlorella* to start synchronization. According to the Japanese research group, it is important to have the same number of divisions for all cells to maintain synchrony and homogeneity in synchronized cultures.

1.3 Materials and methods

1.3.1 *Synchronous culture of N. oleoabundans*

Neochloris oleoabundans UTEX 1185 (Culture Collection of Algae University of Texas, Austin) was synchronized by reproducing the main conditions of synchronization described by de Winter *et al.* (2013).

The preculture was prepared in 500ml shake flasks containing 200 ml of a modified BBM medium (Van Vooren *et al.*, 2012) on a shaking incubator at 150 rpm with a photons flux density (PFD) of 30-50 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

The culture was achieved in a flat panel airlift photobioreactor (PBR) of 6 l with a light path of 4cm and a working volume of 5 l. The incident light was provided to the culture in the front side of the reactor with a set of 6 white fluorescent lamps. The inoculation was made in 1 l of medium and photons flux was increased gradually from 100 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ to the final set 500 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ meanwhile the PBR was filled up to 5 l. When the PFD out was around 50 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ at approximately 0.3 g.l⁻¹ dry weight, the average PFD (in the direction of the culture depth) was 200 $\mu\text{moles}_{\text{hv}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Light/dark cycles of 16 h/8 h and a dilution in semi-continuous mode were started. Fresh medium was continuously supplied during the “light” periods and dilution was stopped during “dark” periods. The PBR was covered with a black cloth to protect the culture from any external illuminations. The constant daily dilution rate was set at 1.4 d⁻¹. The pH was set at 7.5 by an automatic injection of CO₂ mixed with the bubbling air. Cell synchronization was monitored by analyzing cell number and cell size distribution during the dark phase.

1.3.2 *Dry weight measurement*

The dry weight of the culture was used as a measure of cell growth. For each measure a triplicate of 3 ml of culture was filtered through a pre-dried and pre-weighted glass fibers filters (Whatman GF/F) using a vacuum pump. The filters containing the biomass were dried for 24 h at 105°C and left for cooling in a desiccator before being weighted. The dry weight (g.ml⁻¹) was calculated as the ratio between the mass (g) of dried biomass with the volume (l) of filtered biomass.

1.3.3 Bead milling disruption

N. oleoabundans cells disruption experiments were performed in a Dyno-mill multi lab from Willy A Bachofen AG (MuttENZ, Switzerland). The bead mill was operated in pendulum mode as already described by Montalescot *et al.*(2015) with 0.37 mm glass beads at 8 ms⁻¹ impeller tip velocity. The bead size 0.37 mm was in the optimal range (0.3 mm-0.4 mm) as found by (Postma *et al.*, 2017) for the disruption of *N. oleoabundans*. The temperature was maintained below 20°C, the flow rate was set at 200 ml.min⁻¹ and the beads volume filling ratio ϕ was 80 %. Samples were collected after the steady state of each pass (3 chamber volumes, constant flow rate, temperature, pressure and cell concentration).

1.3.4 Cell counting and size distribution analysis

Cell counting and cell size distribution were performed for each sample (intact cultures or lysates) using image analysis with the software ImageJ (1.50b, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). Cells were fixed with 2 % v/v of Lugol's iodine. Each sample was placed in two Malassez counting plates and analyzed by a Carl Zeiss optical microscope equipped with an Axioscope A1 camera. 50 pictures were taken on the gridded areas of the Malassez counting plates (25 pictures/plate). The 50 images were treated simultaneously through: a) conversion to 8 bits images; b) thresholding into white and black and c) particle analysis. The thresholding levels were calibrated to have a deviation lower than 10 % with manual counts of 5 pictures picked randomly. For particle analysis, the ratio between pixels and real size was 4 pixels/ μm . Particle shape and particle size were used to differentiate non-disrupted cells from cell debris. For this purpose, the equivalent circular diameter (D_{eqpc} : diameter of an equivalent circle which has the same area of projection as the particle) and the circularity (Circ: ratio between the particle perimeter and the perimeter of a D_{eqpc} -sphere) were used as filters:

$$D_{eqpc} = 2 \times \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (48)$$

$$Circ = 4 \times \frac{A}{\pi D_{eqpc}^2} \quad (49)$$

Where A is the area of projection of the particle.

From the results of size and shape analysis of intact cells, the filtering ranges were set at $2.5 < D_{eqpc} < 9 \mu\text{m}$ and $Circ \geq 0.85$. These values were found a good compromise to count non-disrupted cells without including cell debris.

1.3.5 Cell fragility evaluation

The cell size distributions were divided into 0.5 μm wide size classes and the cell disruption rate of a given size class i was calculated after each pass of the bead mill using (50) and (51):

$$\eta_1(i) = 1 - \frac{C_1(i)}{C_0(i)} \quad (50)$$

$$\eta_j(i) = 1 - (1 - \eta_1(i))^j \quad (51)$$

With $\eta_j(i)$ the disruption rate after the j^{th} pass in the bead mill for the size class i ; $C_j(i)$ the number of cells of the cell size class i remaining in the lysate after the j^{th} pass in the bead mill; $C_0(i)$ is the initial number of cells of the class i in the microalgal suspension.

Cell fragility with bead milling was evaluated through the disruption kinetic constant. As already proven for different types of stirred media mills (Balasundaram *et al.*, 2012; Currie *et al.*, 1972; Schütte *et al.*, 1983) cell disruption kinetics in the bead mill was modeled as a first order one for the overall population as well as for each size class. The kinetic constants K_i (for a given size class i) of disruption were evaluated taking into account a two continuously stirred tank reactor model for hydrodynamics in the equipment as already demonstrated by (Montalescot *et al.*, 2015a). Consequently, the relation between the disruption rate and the kinetic constant of disruption was expressed as for the first pass as:

$$\eta_{1,mod}(i) = 1 - \left[\frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau}{2}\right) \times K_i\right)^2} \right] \quad (52)$$

Where $\tau = \frac{V_{free}}{Q}$, V_{free} (ml) the free volume of the grinding chamber and Q ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) the flowrate of the microalgae suspension in the bead mill. The $\eta_{j,mod}(i)$ of the following passes ($j > 1$) were calculated using (51).

The experimental $\eta_{j,exp}(i)$ and modeled $\eta_{j,mod}(i)$ were fitted using the least square error regression (LSER) to calculate the constant K_i . The same procedure was used to estimate the global kinetic constant K with the fitting of $\eta_{j,exp}$ and $\eta_{j,mod}$.

1.3.6 Protein and chlorophyll a release

The release of soluble protein and chlorophyll a during the disruption was analyzed by measuring the absorbance of the supernatant between 400 and 750 nm after 15 min of centrifugation at 12045 g. Absorbance at 280 nm respectively at 670 nm was used for protein and chlorophyll a quantification.

The release rates of protein (η_p) and chlorophyll a (η_{chla}) in the bead milling lysates were calculated with (6) and (7).

$$\eta_p = \frac{Abs_{280}(j) - Abs_{750}(j)}{Abs_{280,max} - Abs_{750,max}} \quad (53)$$

$$\eta_{Chla} = \frac{Abs_{670}(j) - Abs_{750}(j)}{Abs_{670,max} - Abs_{750,max}} \quad (54)$$

In which $Abs_{280}(j)$ respectively $Abs_{670}(j)$ are the absorbance after the j^{th} pass (1.3 min for each pass in the bead mill).

$Abs_{280,max}$ and $Abs_{670,max}$ respectively are the absorbance of the supernatant of a lysate of the initial sample obtained by high pressure disruption (HPD) at the maximum pressure 2700 bar at 280 and 670 nm.

1.4 Results and discussion

1.4.1 Synchronization of *Neochloris oleoabundans*

After starting the light/dark cycles (16 h/8 h), cell number and size were analyzed at the beginning and at the end of the dark periods. With the applied light/dark regime, the synchronization of the division of *N. oleoabundans* was observed after four cycles (Figure 41). Then, analyzes were achieved each two hours during the dark phase of the 5th cycle. Cell division started between 4 and 6 h after the beginning of the dark period (5th cycle in Figure 41). The *Neochloris* cells were able to reach 1, 2 or 3 commitment points during the growth stage before division as shown in Figure 40.a.

In the 4th and 5th cycle the number of cells increased up to 4-fold during the dark phase (Figure 41). The mother cells (16h cells) had a mean diameter of 5.5 μ m with a standard deviation of 0.9 μ m while the daughter cells (24h cells) had a mean diameter of 3.7 μ m with a standard deviation of 0.5 μ m (blue curves in Figure 42). The size distribution of mother cells slightly wider than daughter cells: the relative standard deviation was 0.16 while it was 0.14 for daughter cells. In fact, as shown in Figure 40.a, the mother cells of *N. oleoabundans* did not reach a homogeneous number of CP: cells at the end of the growth stage (16 h) were not susceptible to divide into the same number of daughter cells even if they were in the same stage of the cell life cycle. The synchronization was not “ideal” in the sense that all the cells didn’t divide into the same number of daughter cells (Senger and Bishop, 1969). Ideal synchronization is hard to obtain and requires starting a homogeneous inoculum otherwise, a cell to cell diversity remains in synchronized cultures as observed by Garz *et al.*(2012) for synchronized *Chlamydomonas* cultures.

In the current study, the mean number of cells per mother cell (Figure 41) was approximatively 4 whereas de Winter *et al* (2013) had an mean of 6.8. Probably, the cells in their experiments had higher growth rate allowing them to reach more commitment points during the

light phase (Bisova and Zachleder, 2014). Indeed, with a smaller culture depth, PBRs have a better homogeneity of the irradiance received by the cells for a given average PFD. Here the PBR had twice larger light path than the PBR in (de Winter et al., 2013a) thus was less performant in light transmission.

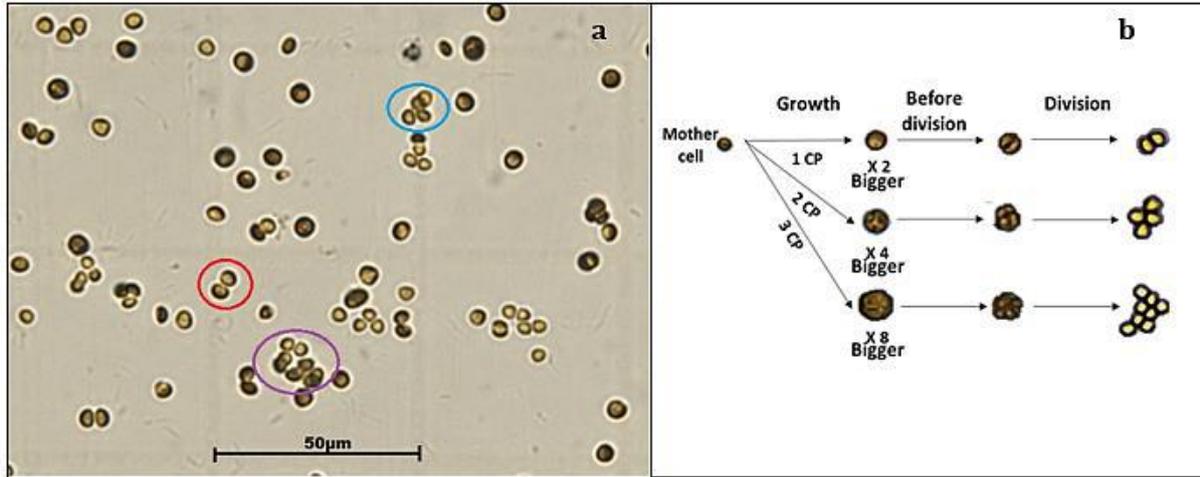


Figure 40 : Pictures of dividing cells of *N. oleoabundans* after 4 h of dark phase: **a** cells can reach 1, 2 or 3 CP (commitment points) during the growth stage and consequently divide into 2 (red circle), 4 (blue circle) or 8 cells (purple circle) **b**: corresponding division steps into 2, 4 or 8 daughter cells.

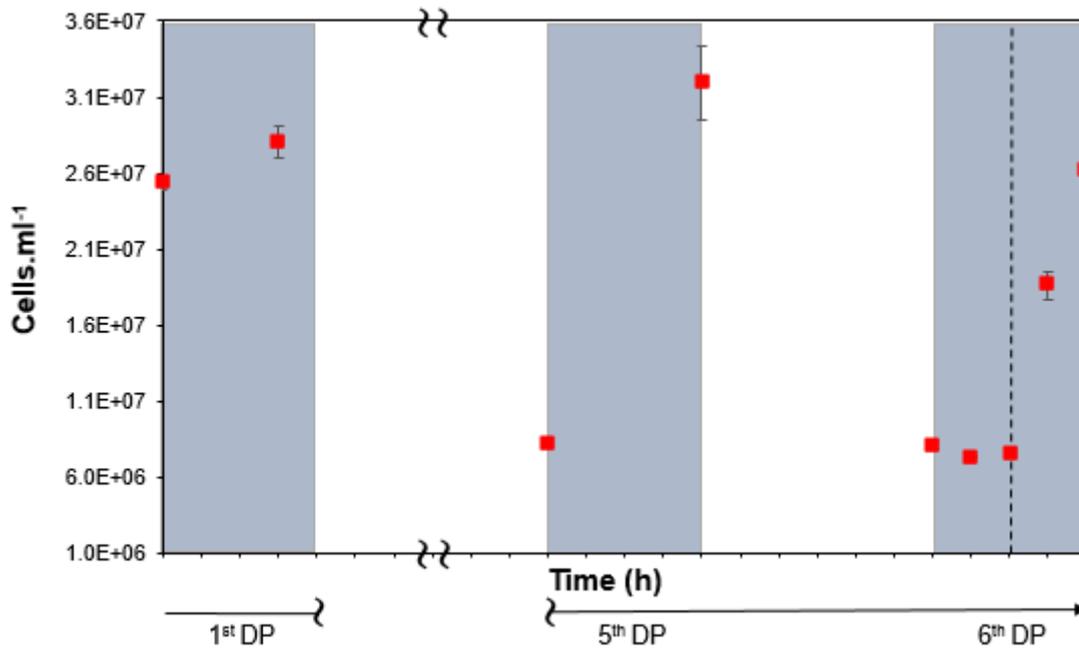


Figure 41 : Evolution of cell density (cell.ml⁻¹) during the dark phases (DP) of the 1st, 5th and 6th 16h/8h light/dark cycles for the synchronization of the culture of *N. oleoabundans*. Cells number is multiplied by 4 during the dark phase after the 5th light/dark cycle indicating a synchronization of cells division.

1.4.2 Effect of cell cycle stage on cell disruption in bead mill

After synchronization (5 cycles), half of the culture at the beginning of the dark phase (16 h cells) was disrupted in the bead mill and the rest of the culture at the end of the dark phase (24 h cells). The evolution of cells mean diameter was followed during bead milling (Table15)

For both life cycle stages (16 h cells and 24 h cells), the mean diameter of the cells decreased in the course of the disruption (Table15). A faster disruption of the bigger cells was observed in both mother and daughter cells. This effect was more noticeable with the 16 h cells (mother cells) given their wider size distribution (Figure 42.a).

Table15 : Evolution of the cells mean diameter (D_{eqpc}) during bead milling: 16 h cells correspond to the cells at the end of the light period (mother cells) and 24 h cells to the cells at the end of the dark period (daughter cells)

Mean D_{eqpc} (μm)		
Time (min)	16 h cells	24 h cells
0.0	5.5	3.7
1.3	5.3	3.6
2.6	5.2	3.5
3.9	4.9	3.5
5.2		3.5
6.5		3.4

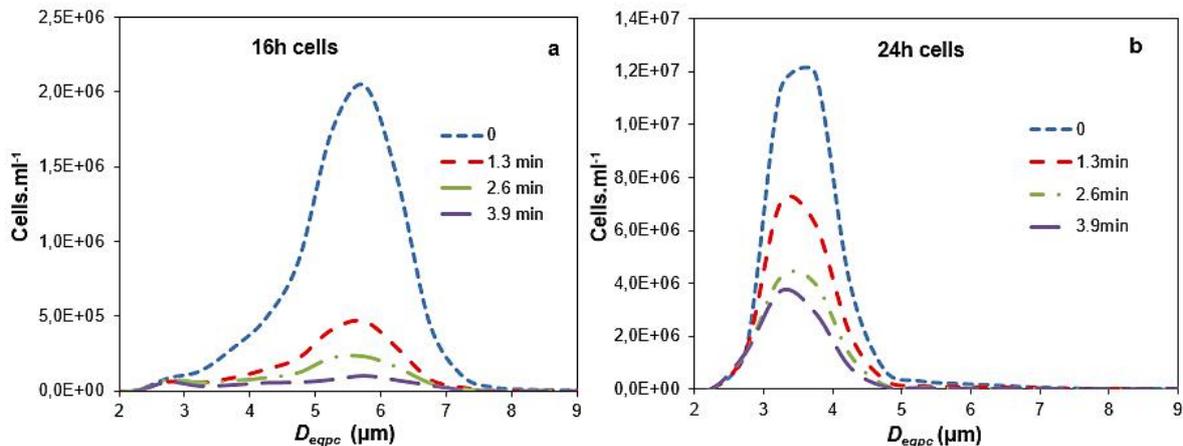


Figure 42 : Evolution of the intact cells density (number of cells per ml of suspension) as a function of the cell size (D_{eqpc}) for different bead milling durations (mean residence time of 0; 1.3 min; 2.6 min and 3.9 min) with 0.37 mm glass beads at $Q=200 \text{ mlmin}^{-1}$, $v=8 \text{ m.s}^{-1}$ and $\varphi=80 \%$: **a** 16 h cells correspond to the cells at the end of the light period (mother cells) and **b** 24 h cells to the cells at the end of the dark period (daughter cells)

Figure 43 presents the disruption kinetic constants according to cell size. The blue points refer to the mother cells (16 h) and the red ones to the daughter cells (24 h cells). The average disruption kinetic constant of the 16 h cells (1.35 min^{-1}) was about 3 times higher than the

disruption kinetic constant of the 24 h cells (0.45 min^{-1}) Moreover, for a given cell size class, kinetics was faster for mother cells. For example, the cells of $4.75 \mu\text{m}$ size class had a disruption kinetic constant of 0.7 min^{-1} for daughter cells and nearly twice (1.3 min^{-1}) for mother cells. These results highlight the fact that independently of their size the life cycle stage of cells has a large impact on cell fragility: mother cells are more easily disrupted.

It was expectable for bigger cells to be more fragile as they have more surfaces to be exposed to the shear stress in the bead mill. An effect of the composition of cell wall and cell membrane when cells are preparing for division might also be in cause on the lower mechanical resistance of mother cells.

Moreover, mother cells of *N. oleoabundans* have higher content in storage molecules such as starch and fatty acids than daughter cells (de Winter *et al.*, 2013). De Winter *et al.* (2017) did not found differences in compositions (protein, starch and total fatty acids) between *N. oleoabundans* cells cultivated with light/dark cycles in “block” (continuous light in the light phase) and light/dark cycles in ‘sine’ (using a sine function to simulate light intensities from sunrise to sunset). Their results suggested that the mother cells obtained in the current study may have a similar composition as mother cells obtained with light/dark cycles simulating outdoor conditions. The higher disruption kinetics of mother cells tends to emphasize a supplementary advantage (with the high product content) of harvesting outdoor cultivated microalgae at sunset for biorefinery purposes. It could imply a cost saving in the cell disruption step while offering higher recovery of products in the extraction step.

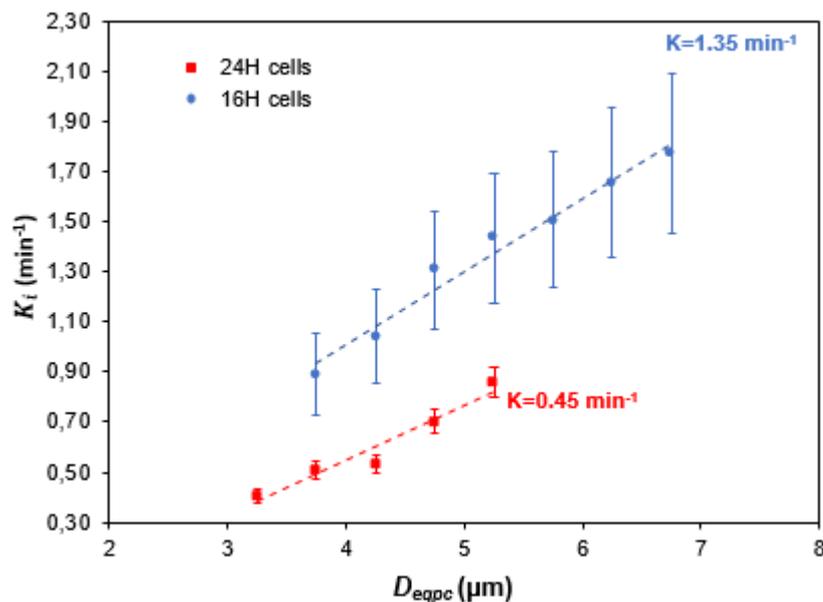


Figure 43 : Evolution of the disruption kinetic constants K_i of the cell size classes with the cell size (D_{eqpc}) during bead milling disruption of *N. oleoabundans* mother cells (24H cells) and daughter cells (16 H cells) with 0.37 mm glass beads at $Q=200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $v=8 \text{ ms}^{-1}$ and $\varphi=80 \%$. Error bars represents the uncertainty in the estimation of K_i induced by the standard deviation in cell counting of sample triplicates

1.4.3 Comparison between cell disruption and metabolite release

Figure 44 presents the release of different cells metabolite during bead milling. A classification of the three phenomena can be proposed from the faster kinetics to the slower as following: cell disruption; soluble protein release and chlorophyll a release. In fact, the cell-disruption is referred to the loss of cell wall and cell membrane integrity. When cell wall and membrane are broken, the release of the soluble molecules of the cytoplasm is possible in the water phase. For chlorophyll a release, a further step is necessary: the membrane of the chloroplast have also to be broken. That might explain the fact that the yields of chlorophyll a(10-40 %) in the supernatant are relatively lower than proteins (20-90 %).Postma et al (2015) found that protein release was faster than cell disruption. The current results are in contradiction with their findings. However, Postma et al (2015) used the maximum released soluble protein obtained from bead milling as a reference (100 % of release) while in this study, the HPD at 2700bar was used as a reference. This was retained here because HPD at 2700 bar released more protein than bead milling.

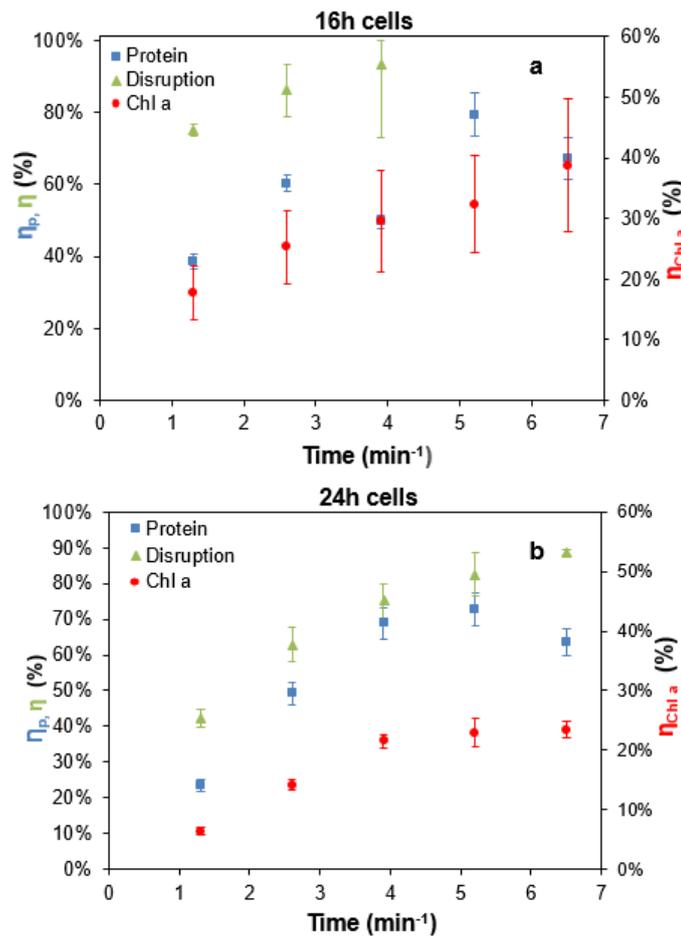


Figure 44 : Evolution of cell disruption η (green curves), soluble protein release rate η_p (blue curves) and chlorophyll a release rate $\eta_{Chl a}$ (red curves) with bead milling disruption time (0.37 mm glass bead; $Q=200 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $v=8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, $\phi = 80 \%$), for the synchronized cells of *N. oleoabundans* cells: **a** 16 h cells corresponds to the mother cells (at the end of the light stage) and **b** 24 h cells to daughter cells (at the end of dark phase). Error bars represent the standard deviation between triplicates.

The maximum disruption yield reached 94 % after 4 min for mother cells (16 h cells) while for daughter cells (24 h cells) 6.5 min were necessary to reach 90 %. For protein release the maximum was 80 % for mature cells against 73 % after 5.2 min. The release of chlorophyll a followed the same trend as protein with a maximum at 39 % for mother cells against 23 % for daughter cells after 6.5 min of disruption. We can conclude that, whatever the metabolites, the bead milling disruption and metabolite release was faster for mother cells than for daughter cells.

1.5 Conclusion

The synchronization of the culture of *N. oleoabundans* was achieved with 16 h/8 h light/dark cycles. The mean number of daughter cells per mother cell was four. When investigating cell disruption through bead milling, mother cells revealed a disruption kinetic constant 3 times higher than daughter cells. The cell life stage had an influence on cell disruption efficiency independently of cell size. Protein and chlorophyll a release rates were also higher in mother cells. The results brought out an interesting advantage of harvesting and post processing outdoor cultures at the end of the day, especially if the aim is to recover reserves metabolites which are accumulated during the day.

2. Effet de la taille des cellules sur la fragilité cellulaire au broyage haute pression

2.1 Broyage haute pression de *P. kessleri* et *C. sorokiniana*

Les résultats précédents ont eu tendance à montrer un effet marqué de la taille des cellules. Le broyage haute pression a donc été utilisé pour évaluer la fragilité cellulaire des cultures de *P. kessleri* et de *C. sorokiniana*. Les biomasses proviennent de deux cultures en continue dont les conditions ont été détaillées dans le Chapitre 2. Ces deux espèces ont été retenues pour leur différence de taille.

Dans la Figure 45, sont comparées les distributions de tailles des deux cultures utilisées. La culture de *P. kessleri* possède une distribution de taille étendue allant de 3 à 9 μm avec une moyenne de 5,6 μm et un écart-type de 1 μm tandis que les cellules de *C. sorokiniana* ont une taille entre 2,5 μm et 7 μm avec une moyenne de 4,3 μm et un écart-type 0,6 μm . En comparant les écart-types relatifs des deux distributions on constate que la souche *P. kessleri* a une distribution plus étalée par rapport à *C. sorokiniana* (0.18 contre 0.14 pour *C. sorokiniana*). Cela pourrait s'expliquer par un nombre de division plus élevé chez *P. kessleri* (observations de cellules se divisant jusqu' à 32 fois).

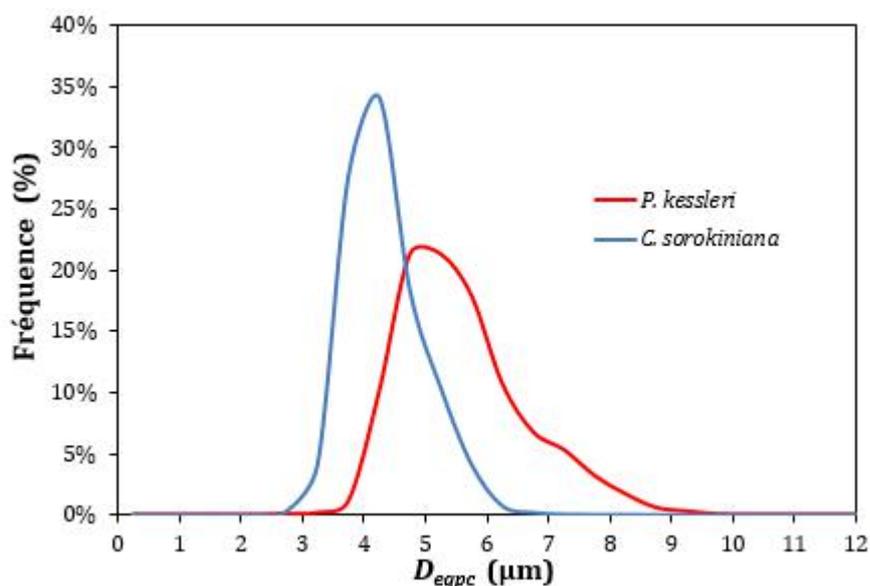


Figure 45 : Distributions de taille des cultures de *P. kessleri* et *C. sorokiniana*

L'analyse de la taille et du nombre de cellules intactes dans les broyats a permis de calculer le taux de destruction par classe de taille en fonction de la pression de broyage variée entre 300 et 1100 bars. A noter que les classes de tailles utilisées ne couvrent pas complètement les gammes de tailles de ces deux microalgues en raison des imprécisions de comptage pour les

classes en queue de distribution statistiquement moins représentées (les cellules les plus petites et les plus grosses).

Les résultats obtenus sont résumés dans la Figure 46. Il est confirmé que les cellules les plus grosses ont un taux de destruction supérieur aux cellules les plus petites pour une pression de travail donnée. Les cellules les plus grosses sont donc plus fragiles au BHP que les cellules les plus petites. L'écart entre grosses cellules et petites cellules est marqué dans la gamme 500-700 bar pour *P. kessleri* avec des différences de taux de destruction entre 55 %- 70 %, et entre 600-800 bar pour *C. sorokiniana* avec des différences de taux de destruction entre 25 %-35 %. Ces gammes de pression mentionnées constituent des zones critiques dans lesquelles la discrimination entre cellules grosses et petites est nette. Cela peut s'expliquer par le fait qu'à basse pression les contraintes et forces sont insuffisantes pour broyer les cellules, tandis qu'au-delà des zones critiques, la pression est suffisamment élevée et supérieure aux résistances des cellules quelle que soient leur taille.

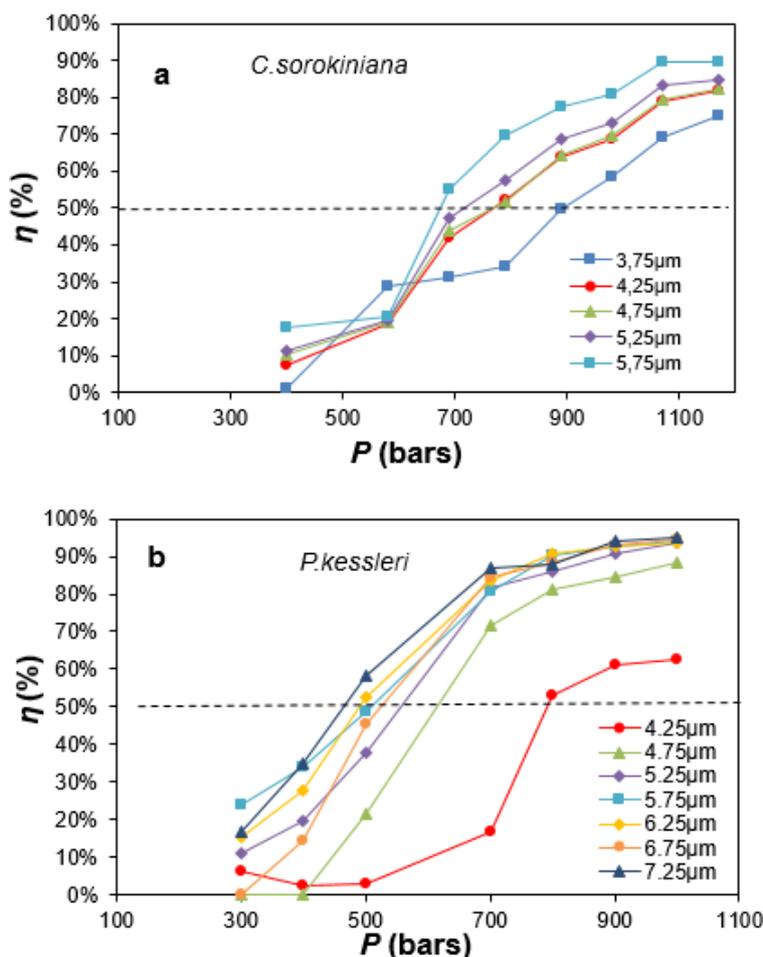


Figure 46 : Taux de destruction des différentes classes de tailles (3,75 µm, 4,25 µm...7,25 µm) au broyage haute pression en fonction de la pression P (bars) pour les cultures de **a** *C. sorokiniana* et **b** *P. kessleri*

Les phénomènes à l'origine du broyage à haute pression : l'écoulement turbulent, la cavitation et l'impact sur la cible (section 2.3.2.3 du chapitre 1) sont accentués par l'augmentation de la pression de travail. Cela justifie l'effet positif de la pression sur le taux de destruction.

Ces résultats permettent également de conclure que le BHP n'a pas une réponse de type « tout ou rien » selon la pression appliquée pour chaque classe de taille. On ne peut pas associer à chaque classe une « pression seuil » en dessous de laquelle une classe n'est pas affectée, et au-delà de laquelle une forte proportion est affectée par le BHP.

2.1 Comparaison *C. sorokiniana* et *P. kessleri*

La superposition des courbes globales de destruction des deux souches sont présentées dans la Figure 47.a. Cela révèle une fragilité globale au BHP plus élevée de *P. kessleri* par rapport à *C. sorokiniana*. La valeur de la pression pour laquelle on atteint 50 % de destruction notée P_{50} obtenue par interpolation linéaire entre deux points expérimentaux a été utilisée comme indicateur de fragilité. Pour la fragilité globale de *P. kessleri* la valeur de P_{50} est 573 bar contre 830 bar pour *C. sorokiniana*. Par la suite, le critère P_{50} a été utilisé pour caractériser la fragilité cellulaire de chaque classe de taille (Figure 47.b). Ce critère confirme à nouveau la fragilité plus élevée des grosses cellules par rapport aux plus petites. L'amplitude des valeurs de P_{50} entre les cellules de *P. kessleri* est plus grande (500-800 bar) qu'avec *C. sorokiniana* (700-900 bar). Cela découle du fait que la souche *P. kessleri* a une distribution plus dispersée en taille par rapport à *C. sorokiniana*.

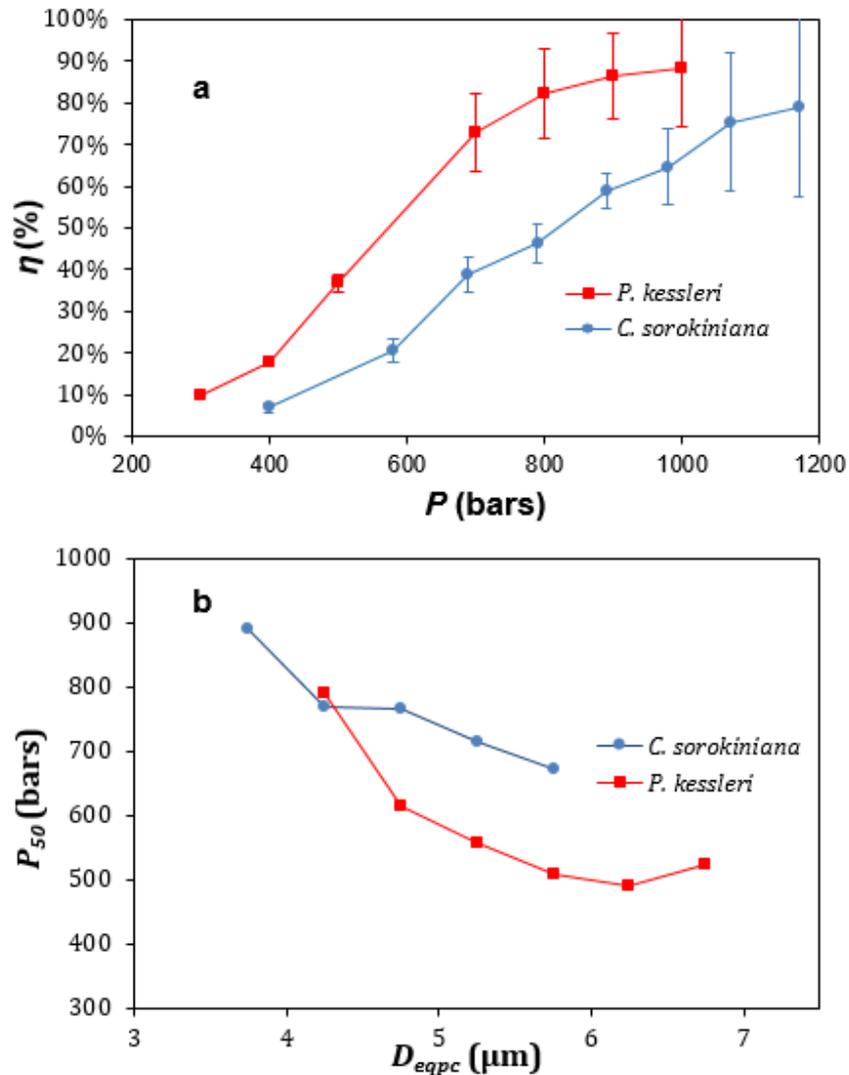


Figure 47 : Comparaison du comportement au BHP de *P. kessleri* et *C. sorokiniana*. **a** courbes de destructions globales des deux souches en fonction de la pression de travail. Les barres d'erreurs représentent les incertitudes estimées à partir de triplicat. **b** pression opératoire pour laquelle on atteint 50 % de destruction en fonction de la taille des cellules pour les deux souches. Les valeurs de P_{50} sont calculées par interpolation linéaire entre deux points expérimentaux

2.2 Effet de fatigue sur la fragilité au broyage haute pression

La fragilité des cellules de *C. sorokiniana* au BHP a également été étudiée en effectuant 3 passages successifs au BHP à 500 bar afin de vérifier l'homogénéité du traitement. En travaillant en dessous de la zone critique de *C. sorokiniana*, on s'assure que la pression est suffisamment basse pour ne permettre que le broyage des classes de tailles les plus fragiles et les plus sensibles. Pour les passages successifs on obtient des taux de destruction globaux de 21 %, 26 % et 40 % respectivement pour 1, 2 et 3 passages au broyeur. Les courbes de destruction selon la taille sont présentées dans la Figure 48. Entre le premier et le deuxième passage, il n'y a pas d'évolution significative du taux de destruction. Les cellules sensibles au traitement ont déjà été

broyées. Le BHP apparait donc comme un procédé homogène car toutes les cellules sensibles aux conditions sont broyées au premier passage. En revanche, une nette augmentation du taux de destruction est observée au troisième passage à l'exception des plus grosses cellules (6,25 μm) pour lesquelles l'évolution est peu notable. Les cellules de taille moyenne et petite qui sont les moins fragiles semblent donc être affectées par un effet de fatigue mécanique après plusieurs passages.

La légère augmentation du nombre de cellules broyées au deuxième passage laisse sous-entendre que pour chaque classe de taille, il y a une fraction de cellules plus fragile que l'autre. En se rapportant aux résultats de la section 1.4.1, cela pourrait s'expliquer par le fait que dans une classe de taille donnée, il existe à la fois des cellules filles et des cellules mères. Les cellules mères étant plus fragiles que les cellules filles, elles seraient alors les premières affectées au premier passage.

Ce type d'expérience pourrait donc permettre d'avoir une approximation des proportions de cellules filles et cellules mères dans chaque classe de taille. Cependant, ces hypothèses ne peuvent être confirmées qu'en couplant à l'analyse de taille une quantification du nombre de copies d'ADN (par exemple par fluorescence de l'ADN avec l'iodure de propidium). Cela permettrait de connaître à la fois la taille et la phase de cycle des cellules (par le nombre de copies d'ADN).

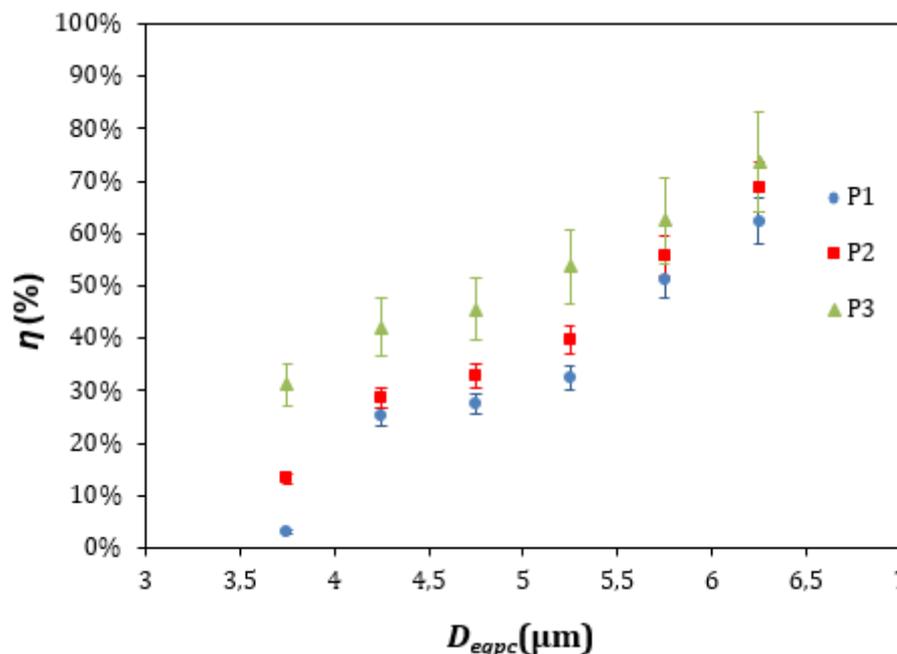


Figure 48 : Taux de destruction au Broyage Haute Pression en fonction de la taille des cellules de *C. sorokiniana* pour 3 passages successifs : P1, P2 et P3 à 500 bar. Les barres d'erreurs représentent l'incertitude estimée à partir du comptage de triplicat.

CONCLUSION

L'étude du broyage à billes d'une culture synchronisée de *N. oleoabundans* a permis de souligner l'impact de l'âge des **cellules** sur leur fragilité : les cellules les plus **matures** (cellules mères) ont une **cinétique** de destruction **trois fois plus rapide** que les cellules les plus **jeunes** (cellules filles). Les deux états du cycle de vie cellulaire opposés combinent également l'effet de la taille et de la composition des cellules (état physiologique). Les cellules mères sont plus grosses et contiennent plus de molécules de réserve tandis que les cellules filles sont plus petites et contiennent moins de réserve. La synchronisation n'étant pas parfaite (chevauchement des distributions de tailles pour les deux états, et nombre de division non uniforme des cellules), les classes médianes (4 μm -5 μm) se retrouvent dans les deux états du cycle et permettent de constater qu'indépendamment de la taille, l'étape du cycle de vie des cellules a un impact sur leur fragilité au broyage à billes. Cette étude a permis de confirmer la complexité de l'inclusion de la disparité des cellules dans la modélisation du broyage à billes. La synchronisation des cultures de microalgues étant obtenue dans des conditions particulières, l'impact de la disparité des cellules sera limité à l'effet de la taille des cellules qui est un critère facile à mesurer dans la suite de l'étude. Ainsi, pour la suite des travaux l'effet apparent de la taille va être utilisé pour la modélisation du broyage à billes.

Dans la dernière partie, le **BHP** a été utilisé comme une **méthode de pré-caractérisation** rapide de la fragilité des souches *P. kessleri* et *C. sorokiniana* qui seront utilisées pour la modélisation du broyage à billes. Cette méthode a mis en évidence une fragilité plus importante des grosses cellules par rapport aux petites cellules confirmant les tendances observées avec l'étude de *N. oleoabundans* au broyeur à billes. Un effet de **fatigue mécanique** a aussi pu être mis en avant lors de passages répétés dans le broyeur.

Chapitre 4 : Modélisation du broyage à billes de microalgues

Résumé :

Ce chapitre présente les résultats de la modélisation de la cinétique de broyage à billes de *C. vulgaris* et *P. kessleri*. Une étude expérimentale de la Distribution des Temps de Séjour (DTS) dans le broyeur à billes en variant le débit d'alimentation, la vitesse d'agitation et la taille des billes a d'abord été réalisée afin de modéliser l'hydrodynamique du système. Ensuite, les cinétiques de destruction et de libération de molécules telles que les protéines solubles et la chlorophylle ont été modélisées. Les équations cinétiques ont été déduites pour permettre la détermination à partir de résultats expérimentaux des constantes cinétiques de destruction incluant la taille des microalgues, la DTS et le modèle cinétique.

L'étude paramétrique des effets de la taille des billes, du débit d'alimentation, de la vitesse d'agitation et de la concentration en biomasse a été réalisée. Le modèle de stress a été reformulé en tenant compte de la taille des cellules et appliqué à la prédiction des cinétiques de destruction. L'application pour la libération sélective des protéines solubles de *P. kessleri* a été discutée.

INTRODUCTION	107
1. Etude de la DTS dans le broyeur et de la cinétique de broyage	108
1.1 Effet des paramètres opératoires sur la DTS.....	108
1.2 Validation de l'ordre de la cinétique de broyage	113
1.3 Choix du modèle de DTS pour la modélisation de la cinétique de broyage..	114
1.4 Importance de la DTS pour l'évaluation de la cinétique de destruction	116
2. Bilans matières et équations cinétiques de broyage	118
3. Etude paramétrique de la cinétique de broyage à billes	120
3.1 Effet du débit sur la cinétique de broyage	120
3.2 Effet du diamètre des billes	121
3.3 Effet de la vitesse d'agitation	123
3.4 Effet de la concentration des cultures	125
4. Modèle de Stress	126
4.1 Adaptation du modèle de stress au cas des microalgues	126
4.2 Validation expérimentale des hypothèses.....	128
4.3 Application du modèle sur <i>C. vulgaris</i> et <i>P. kessleri</i>	129
4.4 Conditions de libération sélective des protéines et de la chlorophylle a	134
CONCLUSION	136

INTRODUCTION

Pour l'étude des performances des procédés opérés en continu, il est nécessaire de prendre en compte la distribution des temps de séjour (DTS). En particulier, dans les broyeurs agités, il est prévisible que la DTS s'écarte du comportement d'un réacteur piston et qu'il y ait une forte dispersion des temps de séjour autour du temps de passage. Pourtant, pour la destruction de microorganismes, l'impact de DTS dans l'estimation des cinétiques de destruction n'est pas systématiquement pris en compte (Doucha and Lívanský, 2008; Postma *et al.*, 2017, 2015). Ici, une étude expérimentale dans les gammes des conditions de broyage est proposée afin de modéliser la DTS.

Les cinétiques de destruction cellulaire de microorganismes et de libération des molécules de microorganismes ont déjà été modélisées avec des modèles cinétiques de premier ordre par plusieurs auteurs (Balasundaram *et al.*, 2009 ; Currie *et al.*, 1972 ; Doucha and Lívanský, 2008 ; Garrido *et al.*, 1994 ; Montalescot *et al.*, 2015 ; Postma *et al.*, 2015). Cette hypothèse sera évaluée expérimentalement pour les microalgues *P. kessleri* et *C. vulgaris* et particulièrement pour la cinétique de destruction par classe de taille.

L'influence des paramètres opératoires sur l'efficacité de destruction cellulaire a été abordée par plusieurs études. (Schütte and Kula, 1988 ; Heimet *et al.*, 2007 ; Doucha and Lívanský, 2008 ; Mayerhoff *et al.*, 2008 ; Montalescot *et al.*, 2015 ; Postma *et al.*, 2017). Si l'impact de l'augmentation de la vitesse d'agitation est unanimement reconnu comme un facteur d'activation, les autres paramètres tels que la taille de billes, le débit d'alimentation et la concentration cellulaire sont encore peu maîtrisés et nécessitent plus d'investigation et d'adaptation selon la géométrie du broyeur et les propriétés des microorganismes étudiés. Une étude paramétrique est donc indiquée afin de permettre le choix de ces paramètres opératoires.

Le modèle de stress est un outil qui permet de mettre en évidence l'effet combiné des paramètres opératoires du broyage à billes en tenant compte des mécanismes de broyage. Ce modèle issu du broyage de matériaux cristallins a été adapté au cas des microorganismes afin de permettre de choisir des conditions opératoires optimisant la consommation énergétique (Kwade and Schwedes, 2002, 2007; Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2017). Cependant, jusqu'à présent ce modèle a été utilisé sans inclure l'effet de la taille des microalgues et aucune corrélation directe entre les cinétiques de destruction avec les paramètres opératoires n'a été établie. C'est donc un point original de cette partie sur la modélisation du processus de broyage.

1. Etude de la DTS dans le broyeur et de la cinétique de broyage

1.1 Effet des paramètres opératoires sur la DTS

L'effet de la taille des billes, de la vitesse d'agitation et du débit d'alimentation sur la DTS dans le broyeur à billes a été évalué expérimentalement. A chaque paramètre ont été attribuées les valeurs maximale et minimale dans les plages utilisées pour les expériences de broyage (voir Tableau 16).

L'acquisition de la DTS est faite par injection de type impulsion d'une solution de chlorure de sodium et d'un suivi de la conductivité à la sortie du broyeur selon le protocole détaillé dans la section 4.2 du chapitre 2. L'étude du mouvement du fluide et de billes individuelles dans le broyeur, a mis en évidence pour des suspensions diluées que les particules de petite taille (ratio diamètre disques sur diamètre particules > 120) suivent le mouvement du fluide (Kwade *et al.*, 1996). Cette valeur limite correspond à des billes en verre (densité 2500 kg.m⁻³) de diamètre inférieur à 0,5 mm pour le broyeur d'étude (dont les disques ont un diamètre de 64 mm). Ainsi, pour les microalgues étudiées qui sont moins denses avec des tailles de l'ordre de 10 µm, il est raisonnable de supposer que les cellules suivent le mouvement du fluide. Le sel solubilisé dans l'eau peut donc être utilisé comme traceur pour mesurer la distribution des temps de séjour des microalgues.

Les disques d'agitation dans le broyeur créent une recirculation de la suspension dans un mouvement centrifuge/centripète alors que le flux principal est longitudinal. Il est donc légitime de penser que La distribution des temps de séjour est intermédiaire entre les modèles du réacteur piston et du réacteur parfaitement agité. Les modèles de cascades de réacteurs parfaitement agités (n-RPA) ont été utilisés avec succès pour modéliser la DTS des broyeurs à disques d'agitation (Schwedes and Bunge, 1992; Limon-Lason J. *et al.*, 1979; Kula and Schütte, 1987; Kwade and Schwedes, 2007; Montalescot *et al.*, 2015). Dans la présente étude deux approches ont été évaluées :

- Considérer un modèle cascade de n-RPA et trouver la valeur du nombre de compartiments n en minimisant l'erreur quadratique entre la DTS expérimentale et la DTS modèle.

Dans ce cas l'expression analytique de la DTS est déterminée à partir des bilans matière et la transformée de Laplace. L'expression analytique de la DTS d'une cascade de n-RPA est donnée par :

$$E(t) = \left(\frac{n}{\tau}\right)^n \frac{t^{n-1} \exp\left(-\frac{nt}{\tau}\right)}{(n-1)!} \quad (55)$$

- Considérer un modèle de cascade de n-RPA avec recirculation, n étant fixé par le nombre de disques d'agitation. Dans le cas du broyeur d'étude n vaut donc 4.

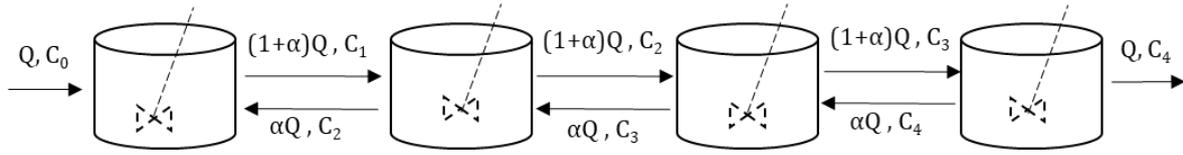


Figure 49 : Schéma du modèle cascade RPA avec recirculation

Les bilans en traceurs pour chaque RPA s'écrivent selon les équations :

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{4}{\tau} (C_0 - (1 + \alpha)C_1 + \alpha C_2) \quad (56)$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{4}{\tau} [(1 + \alpha)C_1 - (1 + 2\alpha)C_2 + \alpha C_3] \quad (57)$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{4}{\tau} [(1 + \alpha)C_2 - (1 + 2\alpha)C_3 + \alpha C_4] \quad (58)$$

$$\frac{dC_4}{dt} = \frac{4}{\tau} [(1 + \alpha)C_3 - (1 + \alpha)C_4] \quad (59)$$

α désigne le ratio entre le débit de recirculation et le débit d'alimentation du broyeur Q et C_j les concentrations en traceur dans le $j^{\text{ème}}$ RPA.

Les équations sont résolues numériquement par la méthode des différences finies avec un pas de temps $\Delta t = 1$ s correspond au pas d'enregistrement du conductimètre.

L'approximation des différences finies permet d'écrire l'expression de la dérivée selon la relation :

$$\frac{dC_j(i)}{dt} \approx \frac{C_j(i+1) - C_j(i)}{\Delta t} \quad (60)$$

i désigne un pas temps donné et C_j la concentration dans le RPA j ($1 \leq j \leq 4$)

En appliquant l'approximation de l'équation (60) aux équations (56), (57), (58) et (59), on peut calculer par itération les concentrations $C_j(i)$ ($1 \leq j \leq 4$) de l'itération $i + 1$ en fonction des valeurs $C_j(i)$ ($1 \leq j \leq 4$) de l'itération i . Selon les relations (61), (62), (63) et (64).

$$C_1(i+1) = C_1(i) \left[1 - \frac{4\Delta t}{\tau} (1 + \alpha) \right] + \frac{4\Delta t}{\tau} [C_0(i) + \alpha C_2(i)] \quad (61)$$

$$C_2(i+1) = C_2(i) \left[1 - \frac{4\Delta t}{\tau} (1 + 2\alpha) \right] + \frac{4\Delta t}{\tau} [(1 + \alpha)C_1(i) + \alpha C_3(i)] \quad (62)$$

$$C_3(i+1) = C_3(i) \left[1 - \frac{4\Delta t}{\tau} (1 + 2\alpha) \right] + \frac{4\Delta t}{\tau} [(1 + \alpha)C_2(i) + \alpha C_4(i)] \quad (63)$$

$$C_4(i+1) = C_4(i) \left[1 - \frac{4\Delta t}{\tau} (1 + \alpha) \right] + \frac{4\Delta t}{\tau} [(1 + \alpha)C_3(i)] \quad (64)$$

Les valeurs de concentrations sont initialisées pour $C_0(0)$ avec la quantité totale de sel introduite. Les concentrations $C_2(0), C_3(0)$ et $C_4(0)$ ont une valeur initiale nulle.

La valeur de α est alors ajustée en minimisant l'erreur quadratique entre le signal enregistré et la valeur théorique de $C_4(t)$. Un exemple d'ajustement de la DTS avec les deux modèles est présenté en Figure 49. L'allure de la courbe expérimentale de la DTS est typique des courbes obtenues pour des broyeurs à disques d'agitation indépendamment de la méthode utilisée (colorimétrie ou conductimétrie) (Schwedes and Bunge, 1992; Limon-Lason J. *et al.*, 1979; Kula and Schütte, 1987; Kwade and Schwedes, 2007; Montalescot *et al.*, 2015). Le pic apparaît en général rapidement autour d'un temps réduit de 0,5 avec une hauteur proche de 1 et est suivi d'une longue trainée et des valeurs proches de 0 après un temps réduit de 4.

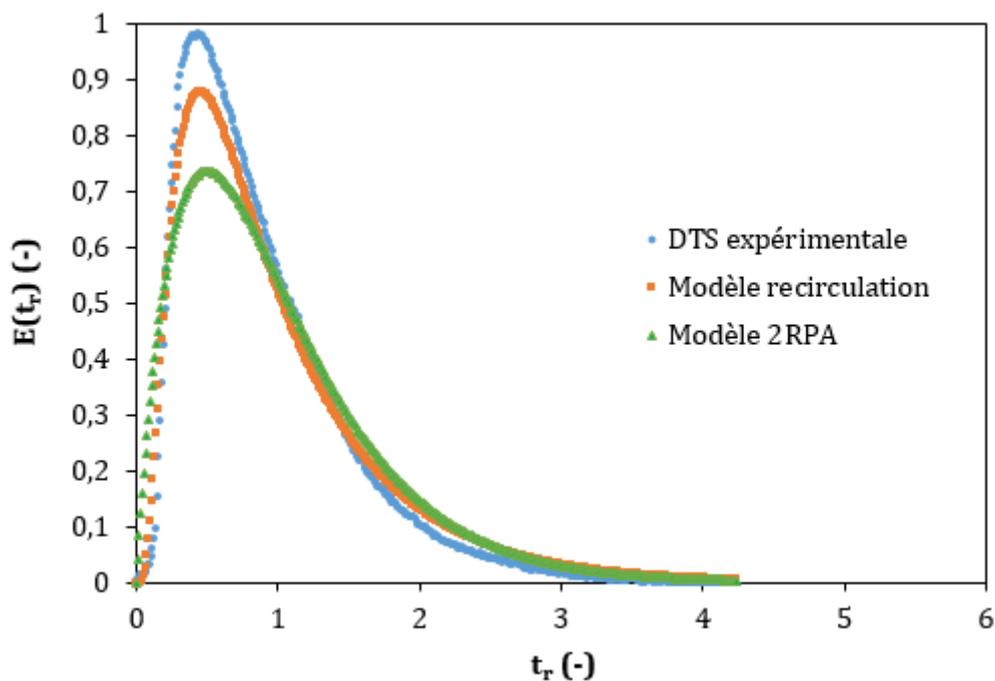


Figure 50 : Exemple d'ajustement de la DTS expérimentale en bleu avec les modèles 2-RPA en vert et le modèle avec recirculation en orange (nombre de RPA fixé à 4) ($d_B = 0,375$ mm ; $v = 8$ ms⁻¹ et $Q = 170$ ml.min⁻¹). $E(t_r)$ désigne la fonction distribution de temps de séjour et t_r le temps réduit (rapport entre le temps expérimental et le temps de passage).

Les résultats d'ajustement de la DTS expérimentale avec les deux modèles sont résumés dans le Tableau 16.

Les valeurs obtenues du taux de recirculation sont en adéquation avec les résultats de Limon-Lason J. *et al.* (1979) avec la même géométrie de broyeur (volume de chambre 0,6 l et 4 disques d'agitation en polyuréthane). Pour leurs expériences, les valeurs de α étaient comprises

entre 2,5 et 8 pour des vitesses d'agitation entre 10 et 14m.s⁻¹ et des débits entre 60 et 700ml.min⁻¹.

Tableau 16 : Récapitulatif de l'étude de la DTS dans le broyeur avec d_B le diamètre des billes, v la vitesse en bout de pale, Q le débit d'alimentation, T_s le temps de séjour moyen, T_p le temps de passage, n le nombre de RPA en série et α le taux de recirculation

d_B (mm)	v (m.s ⁻¹)	Q (ml.min ⁻¹)	$T_s.T_p^{-1}$	Ecart-type relatif expérimental	n	α
0,375	8	45	0,89	0,7	2	2,9
0,375	8	170	0,89	0,6	2	1,1
0,375	14	45	1,13	0,8	2	1,7
0,375	14	170	0,98	0,8	2	1,2
1,3	8	45	1,34	1,1	2	4,3
1,3	8	170	0,96	0,9	1	3,1
1,3	14	45	1,45	1,1	2	1,7
1,3	14	170	0,98	0,6	3	0,4

Le calcul de l'écart-type relatif des DTS pour toutes les conditions testées (5^{ème} colonne Tableau 16), met en évidence que l'utilisation de petites billes permet d'avoir une DTS moins dispersée qu'avec des billes plus grosses. En effet, Kwade and Schwedes(2007) suggèrent d'utiliser des billes plus petites pour avoir des broyats de matériaux cristallins avec une distribution de taille resserrée. Plus la distribution du temps de séjour est étroite, plus les particules ont un temps de séjour homogène dans le broyeur et donc subissent un nombre de stress homogène conduisant à une distribution de taille de produit plus resserrée.

L'augmentation du débit d'alimentation permet également d'avoir une distribution plus étroite : par exemple l'écart-type relatif passe de 0,7 à 0,6 avec les billes de 0,375 mm et de 1,1 à 0,9 avec les billes de 1,3 mm à la vitesse 8 m.s⁻¹ (colonne 5 Tableau 16). Cela s'explique par le fait qu'en augmentant le débit on augmente le transport convectif de la matière par rapport à la recirculation. L'augmentation du débit se traduit notamment par une réduction du taux de recirculation. La recirculation est très faible à fort débit et pour les billes les plus grosses ($\alpha = 0,4$). Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'études similaires sur la DTS (Kula and Schütte, 1987; Limon-Lason J. *et al.*, 1979; Schwedes and Bunge, 1992) dont un exemple est présenté en Figure 51. On y constate une augmentation du nombre de Péclet avec la vitesse de transport axial proportionnelle au débit d'alimentation.

Les résultats présentés ne permettent pas de conclure de manière tranchée sur l'effet de la vitesse d'agitation sur l'étalement de la DTS. Néanmoins, on s'attend à ce que l'augmentation de la vitesse d'agitation augmente le transport diffusif et donc l'étalement de DTS. Ce phénomène est mieux constaté avec les billes de 0,375 mm (colonne 5 Tableau 16). Cela a également été mis en évidence par Kula and Schütte (1987) et Schwedes and Bunge (1992) dont les travaux ont montré que l'augmentation de la vitesse d'agitation entraîne une diminution de l'étalement de la DTS correspondant à une diminution du nombre de Péclet (ou du nombre de RPA) (Figure 51).

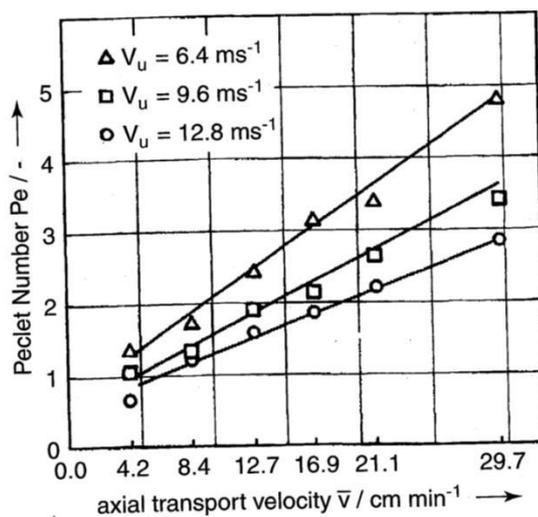


Figure 51 : Nombre de Péclet en fonction de la vitesse de transport axial \bar{v} et la vitesse d'agitation V_u (Schwedes and Bunge, 1992)

Cette étude a permis de montrer un effet important des paramètres opératoires sur la forme de la DTS. Le modèle de cascade de n-RPA semble limité pour décrire les variations de la forme de la DTS : le nombre de RPA vaut 2 pour la plupart des conditions. Des valeurs similaires ont été trouvées dans les travaux de Limon-Lason J. *et al.*(1979) et Montalescot *et al.* (2015) pour des broyeurs de même volume (0,6 l) avec 4 disques d'agitation. Ce modèle ne permet donc pas de refléter finement l'hydrodynamique dans le broyeur qui en réalité possède 4 disques donc 4 compartiments agités. Cependant, avec le modèle avec recirculation, l'effet des paramètres est reflété dans le taux de recirculation et l'ajustement avec la DTS expérimentale est plus précis (Voir annexe). De plus, la recirculation entre deux disques d'agitation a déjà été mise en évidence expérimentalement : après injection d'un traceur entre le premier et le second disque d'agitation, le traceur a été détecté dans la zone en amont du premier disque (Limon-Lason J. *et al.*, 1979).

1.2 Validation de l'ordre de la cinétique de broyage

L'hypothèse d'une cinétique de premier ordre pour la destruction cellulaire a été éprouvée dans les conditions de broyage testées pour les microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri*. La vérification est faite ici autant pour la cinétique globale que pour les cinétiques de destruction par classe de taille. Chaque point expérimental correspond donc à un passage dans le broyeur.

Pour une cinétique de premier ordre l'évolution de la concentration en cellules au cours du temps s'écrit sous la forme :

$$C(t) = C_0 \exp^{-Kt} \quad (65)$$

K (min^{-1}) désignant la constante cinétique de la destruction cellulaire et C_0 la concentration initiale en cellules (en nombre de cellules par ml).

Pour un modèle de DTS de 2-RPA, chaque passage au broyeur équivaut à un temps de traitement distribué autour de τ (min) (temps de séjour moyen dans le broyeur).

Dans la Figure 52 sont représentées les valeurs de $\ln \frac{C(t)}{C_0}$ en fonction du temps de séjour dans le broyeur. Les expériences de broyage sont faites en mode pendule (5 passages successifs en continu) avec un temps de séjour moyen qui vaut 1,3 min par passage.

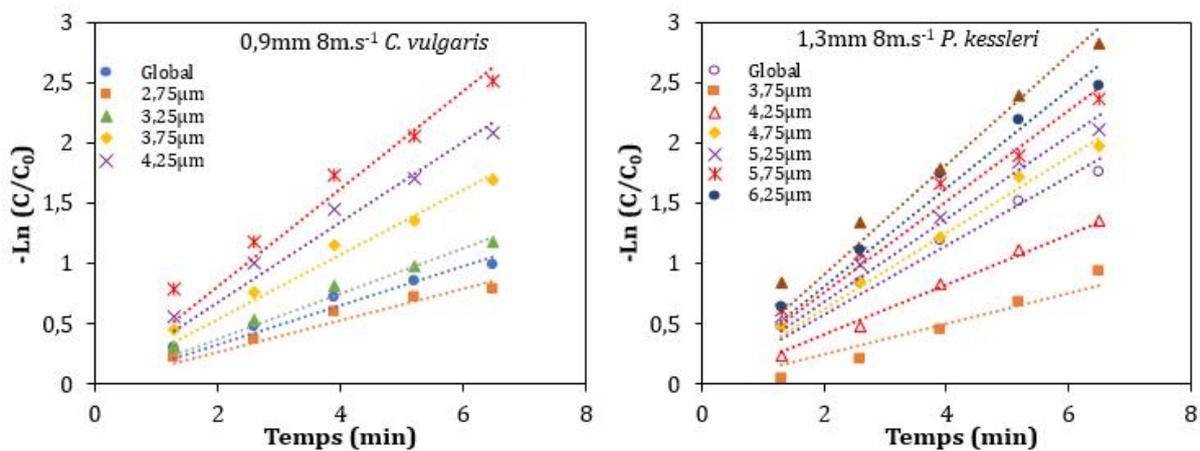


Figure 52 : Représentation de $-\ln (C/C_0)$ (C_0 et C les concentrations en cellules respectives avant broyage et après une durée de broyage donnée) en fonction du temps de broyage. Les tendances linéaires montrent un bon ajustement de la cinétique de destruction avec une cinétique d' ordre 1 autant pour les cinétiques globales que pour les cinétiques par classe de taille (2,75µm, 3,25µm ...6,25µm) avec deux conditions de broyage différentes des cultures de *C. vulgaris* et de *P. kessleri*

On constate pour les deux espèces de microalgues autant pour la cinétique globale que pour la cinétique par classe de taille une tendance linéaire. La destruction cellulaire suit bien une cinétique de 1^{er} ordre quelle que soit la taille des cellules et ce pour les deux souches étudiées ici.

Un exemple d'allure type de l'ajustement avec un ordre 1 pour la destruction cellulaire, la libération des protéines et de la chlorophylle a pour *P. kessleri* est présenté en Figure 53. La

cinétique de 1^{er} ordre est validée pour la libération la chlorophylle a mais pour la libération des protéines uniquement pour les premiers points. En effet on a constaté que la libération maximale des protéines était atteinte dès le 3^{ème} passage. Peu d'amélioration du taux de libération des protéines soluble est observé après. Les plateaux observés peuvent être attribués à une dégradation partielle des protéines à des niveaux de destructions élevés ou à des interférences de la méthode BCA avec les sucres. Ces résultats permettent également de classer par ordre de rapidité : la cinétique de destruction, la cinétique de libération des protéines et enfin la cinétique de libération de la chlorophylle a. Ainsi, le broyage à billes permet de libérer sélectivement des molécules cytoplasmiques tels que les protéines solubles par rapport à la chlorophylle a qui dans le chloroplaste. Des résultats similaires ont été mis en évidence au laboratoire par les travaux de Montalescot (2015).

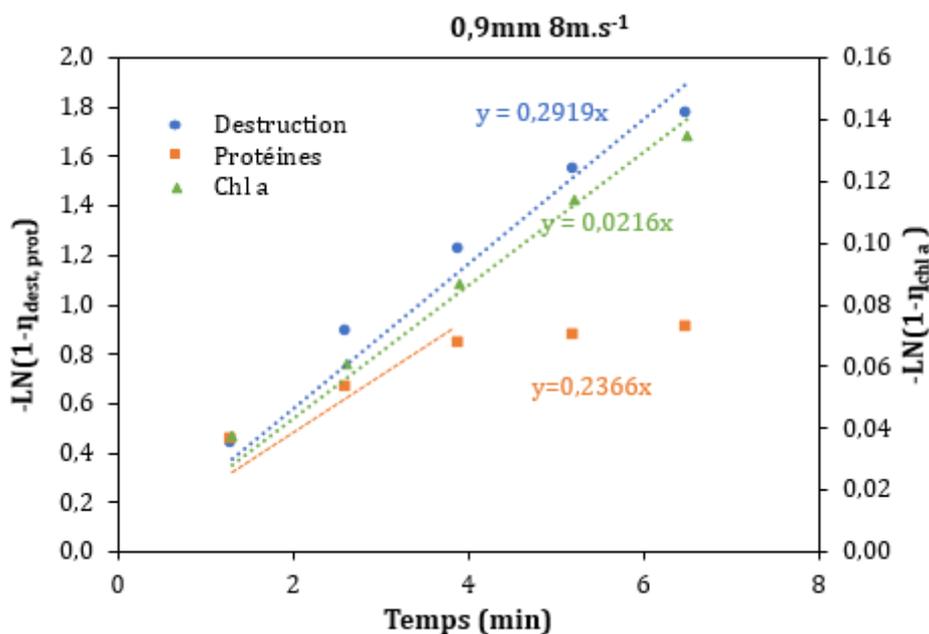


Figure 53 : Allure typique d'ajustement avec un 1^{er} ordre des cinétiques de destruction (ronds bleu), de libération des protéines (carrés oranges) et de la chlorophylle a (triangles verts) pour *P. kessleri*. Chaque point correspond à un passage au broyeur et donc à un temps de traitement correspondant au temps de séjour moyen à chaque passage. La tendance linéaire pour la destruction et la chlorophylle a montrent une cohérence avec un ordre 1. Pour les protéines il y a un plateau après le 3^{ème} passage pouvant être dû à une dégradation partielle des protéines pour des niveaux de broyage avancés.

1.3 Choix du modèle de DTS pour la modélisation de la cinétique de broyage

L'ajustement des DTS expérimentales avec les modèles n-RPA et 4-RPA avec recirculation a montré que le second modèle était le plus approprié. En effet les écarts entre courbe expérimentale et modèle avec recirculation étaient réduits (Voir annexe).

Néanmoins afin de trancher sur le modèle à utiliser dans cette étude, nous avons comparé les précisions que peuvent apporter ces deux modèles sur la détermination de la constante cinétique. Pour cela le taux de destruction effectif de cellules pendant un pas de temps Δt entre les temps $i - 1$ et i est calculé en utilisant la DTS expérimentale par la relation :

$$\eta(i) = (1 - \exp^{-K_{exp}i})E(i)\Delta t \quad (66)$$

Où i correspond au pas de temps de calcul K_{exp} la constante cinétique calculée avec la DTS et $E(i)$ la valeur de la fonction densité de distribution de la DTS au pas de temps i .

Le taux de destruction total atteint en régime permanent correspond à la somme des fractions détruites entre le début et le temps à partir duquel le régime permanent est atteint. On peut alors ajuster la valeur de K_{exp} pour minimiser l'écart quadratique entre le taux de destruction total calculé et celui observé expérimentalement η_{exp} .

De la même manière, on calcule le taux de destruction total théorique avec la DTS théorique ajustée par le modèle de recirculation. On ajuste à nouveau la constante K_{recirc} du modèle de recirculation pour minimiser l'écart quadratique entre la conversion théorique et la conversion expérimentale observée.

Pour le modèle 2-RPA, on peut directement calculer la constante K_{2RPA} correspondante à partir de la conversion η_{exp} observée par la relation provenant du bilan matière détaillé dans la section 2 :

$$K_{2RPA} = \frac{2}{\tau} \left(\sqrt{\frac{1}{1 - \eta_{exp}}} - 1 \right) \quad (67)$$

η_{exp} désigne le taux de destruction obtenu expérimentalement en régime permanent.

Ce calcul a été fait pour des conditions où la cinétique de destruction est rapide pour les deux souches *C. vulgaris* et *P. kessleri* (billes de 0,375 mm avec les vitesses 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹). Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessus.

Tableau 17 : Impact du modèle de DTS sur la précision de l'estimation de la constante cinétique de destruction

Microalgue	d_B (mm)	v (m.s ⁻¹)	K_{exp} (min ⁻¹)	K_{2RPA} (min ⁻¹)	$\Delta K_{exp-2RPA}$ (%)	K_{recirc} (min ⁻¹)	$\Delta K_{exp-recirc}$ (%)
<i>C. vulgaris</i>	0,375	8	1,00	0,95	5%	0,94	6%
	0,375	14	1,05	1,17	12%	1,17	12%

<i>P. kessleri</i>	0,375	8	0,85	0,80	5%	0,80	6%
	0,375	14	1,21	1,36	12%	1,33	10 %

On constate que les écarts relatifs entre K_{exp} et $K_{2\ RPA}$ d'une part, et K_{exp} et K_{recirc} d'autre part, sont du même ordre de grandeur avec un maximum de 12 %. Le modèle avec recirculation n'apporte donc pas une précision supplémentaire significative par rapport au modèle 2-RPA dans ces conditions. Par ailleurs, l'utilisation du modèle avec recirculation requiert une étude expérimentale détaillée de la DTS pour chaque condition de broyage testée afin de déterminer le taux de recirculation selon les conditions employées. Or une étude détaillée a déjà été faite pour le modèle avec n-RPA par Montalescot *et al.* (2015) sur le même équipement. Finalement, pour l'évaluation de la cinétique de destruction, le modèle de 2-RPA plus simple à mettre en œuvre a été retenu.

1.4 Importance de la DTS pour l'évaluation de la cinétique de destruction

1.4.1 Analyse des ordres de grandeurs des temps caractéristiques

Par analogie avec les réacteurs chimiques, les temps caractéristiques de la destruction et du transport convectif des cellules ont été comparés. La vitesse de transport des cellules (nombre de cellules par min) est donnée par le produit du débit Q et la concentration en cellule C (nombre de cellules par ml). Pour une cinétique de 1^{er} ordre, le temps caractéristique de la destruction est l'inverse de la constante cinétique. Celui du transport convectif est le temps de passage τ (ratio V sur Q). Le nombre de Damköhler D_a est le ratio entre le temps caractéristique du transport convectif et le temps caractéristique de la réaction :

$$D_a = \frac{K \cdot V}{Q} \quad (68)$$

V (ml) étant le volume net du broyeur (260 ml dans les conditions d'étude)

Un nombre de Damköhler grand (>10) implique que la réaction est rapide par rapport au transport de matière. On peut alors négliger l'effet du transport de matière par rapport à la cinétique si les valeurs de $D_a > 10$

Tableau 18 : Nombre de Damköhler pour les valeurs limites des conditions de broyage (conditions permettant d'obtenir les cinétiques les plus rapides, 2 min⁻¹, ou les plus lentes 0,1 min⁻¹)

Q (ml.min ⁻¹)	K (min ⁻¹)	D_a
50	0,1	0,5

200	0,1	0,1
50	2	10,4
200	2	2,6

D'après les calculs du Tableau 18, même pour des cinétiques de destruction les plus rapides (2 min⁻¹) avec le débit le plus faible, le transport de matière conserve un effet significatif, d'où l'importance de prendre en compte la DTS dans l'estimation de la conversion.

1.4.2 Cinétique apparente et cinétique vraie

En ne tenant pas compte de la DTS, une cinétique apparente peut être calculée qui considère que les particules ont toutes le même temps de séjour dans le broyeur (correspondant au temps de passage dans un réacteur idéal piston).

Avec les expériences réalisées avec *C. vulgaris* et *P. kessleri*, les écarts entre constantes cinétiques apparentes K_{app} et constantes cinétiques avec le modèle 2-RPA K_{2RPA} ont été calculées. Le bilan dans le réacteur permet d'écrire en régime permanent la relation entre le taux de destruction η et la constante cinétique apparente K_{app} selon la relation (56).

$$\eta = 1 - \exp^{-K_{app} \tau} \quad (69)$$

Tableau 19 : Ecart entre constantes cinétiques apparentes et constantes estimées avec le modèle 2-RPA pour *C. vulgaris* ΔK_{2RPA} et ΔK_{app} désignent les pourcentages d'incertitudes de K_{2RPA} et K_{app}

<i>C. vulgaris</i>						
d_B (mm)	v (m.s ⁻¹)	K_{2RPA} (min ⁻¹)	ΔK_{2RPA} (%)	K_{app} (min ⁻¹)	ΔK_{app} (%)	$\Delta K_{app-2RPA}$ (%)
0,375	8	1,05	11%	0,80	8%	24%
0,375	14	1,34	19%	0,96	14%	28%
0,625	8	0,39	23%	0,36	26%	8%
0,625	10	0,47	24%	0,41	21%	13%
0,625	14	0,68	12%	0,57	10 %	17%
0,9	8	0,18	6%	0,17	6%	5%
0,9	14	0,27	8%	0,25	7%	9%
0,13	8	0,16	13%	0,15	12%	5%
0,13	14	0,22	3%	0,21	3%	7%

L'erreur d'estimation des constantes cinétiques sans tenir compte de la DTS est significative (colonnes 7 Tableau 19) par rapport aux incertitudes propres à la détermination des constantes cinétiques (colonnes 4 et 6). Cette erreur s'élève jusqu'à 30 % pour les conditions où la cinétique

est rapide (0,375 mm 14 m.s⁻¹). Ces résultats illustrent l'importance d'inclure la DTS dans la détermination des constantes cinétiques et en particulier pour des fins d'extrapolation.

Tableau 20 : Ecart entre constantes cinétiques apparentes et constantes estimées avec le modèle 2 RPA pour *C. vulgaris* ΔK_{2RPA} et ΔK_{app} désignent les pourcentages d'incertitudes de K_{2RPA} et K_{app}

<i>P. kessleri</i>						
d_B (mm)	v (m.s ⁻¹)	K_{2RPA} (min ⁻¹)	ΔK_{2RPA} (%)	K_{app} (min ⁻¹)	ΔK_{app} (%)	$\Delta K_{app-2RPA}$ (%)
0,375	8	0,91	15%	0,71	12%	21%
0,375	10	1,00	20 %	0,77	15%	23%
0,375	14	1,45	23%	1,02	17%	29%
0,625	8	0,96	14%	0,74	11%	22%
0,625	10	1,10	22%	0,83	18%	24%
0,625	14	1,23	13%	0,92	17%	25%
0,9	8	0,35	21%	0,31	19%	10 %
0,9	14	0,51	11%	0,44	9%	14%
0,13	8	0,34	11%	0,32	10 %	7%
0,13	14	0,38	13%	0,36	12%	6%

2. Bilans matières et équations cinétiques de broyage

Les équations permettant l'évaluation des constantes cinétiques à partir des données expérimentales sont développées dans cette partie.

Comme expliqué précédemment, le comportement hydrodynamique du broyeur est assimilé à une cascade de 2-RPA dans les plages expérimentales de notre étude : vitesse (8-14 m.s⁻¹) ; taille des billes (0,25-1,4 mm), débit (40-200 ml.min⁻¹) et taux de remplissage de (85 %). Cette hypothèse est valable pour des suspensions très diluées ayant des viscosités proches de l'eau, car c'est dans ces conditions qu'ont été calés les modèles de DTS. Ceci est vérifié dans le cas des suspensions de microalgues traitées dont la concentration en matière sèche est de l'ordre de 1g.l⁻¹.

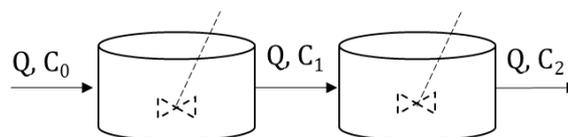


Figure 54 : Modèle de DTS dans le broyeur à billes

L'hypothèse d'une cinétique de 1^{er} ordre permet d'écrire pour chaque RPA en régime permanent un bilan en cellules sous la forme :

$$QC_0 = QC_1 + KC_1 \frac{V}{2} \quad (70)$$

$$QC_1 = QC_2 + KC_2 \frac{V}{2} \quad (71)$$

K (min^{-1}) : la constante de destruction

Q (ml. min^{-1}) : le débit d'alimentation de la suspension

V_{vide} (ml) désigne le volume de vide dans le broyeur calculé selon la relation (72):

$$V_{vide} = V. [1 - \varphi(1 + \varepsilon)] \quad (72)$$

V (ml) : le volume net de la chambre de broyage

φ : le taux de remplissage en volume du broyeur (80 %)

ε : la porosité du lit de billes (0,33).

La combinaison des équations (70) et (71) permet d'écrire

$$\frac{C_2}{C_0} = \frac{1}{\left(1 + K \cdot \frac{\tau}{2}\right)^2} \quad (73)$$

Avec $\tau = \frac{V}{Q}$ le temps de passage dans le broyeur.

Ainsi à la sortie du broyeur pour le premier passage on a η_1

$$\eta_1 = 1 - \frac{1}{\left(1 + K \cdot \frac{\tau}{2}\right)^2} \quad (74)$$

Etant donné que le broyage est effectué en mode pendule, on alimente en entrée du passage j avec la sortie du passage $j - 1$ ainsi par récurrence on établit pour le passage j ($j > 1$) la relation :

$$\eta_j = 1 - (1 - \eta_1)^j \quad (75)$$

La détermination de la constante cinétique de destruction à partir des données expérimentales se fait par la méthode des moindres carrées en utilisant l'outil Solveur d'Excel.

En effet, disposant des taux de destruction expérimentaux $\eta_{j_{exp}}$ obtenus à chaque passage, et des taux de destruction théoriques $\eta_{j_{mod}}$ et $\eta_{j_{mod}}(i)$ exprimés en fonction de K (équation (74)) on peut déterminer K en minimisant l'erreur quadratique $(\Delta E)^2$.

$$(\Delta E)^2 = \sum_{i=1}^n (\eta_{j_{mod}} - \eta_{j_{exp}})^2 \quad (76)$$

La même démarche est utilisée pour la détermination des constantes cinétiques pour chaque classe de taille K_i .

3. Etude paramétrique de la cinétique de broyage à billes

Afin de permettre le choix des paramètres optimaux de broyage des algues étudiées, les effets des différents paramètres opératoires principaux : débit d'alimentation, diamètre des billes, vitesse d'agitation, et concentration des suspensions ont été étudiés séparément.

3.1 Effet du débit sur la cinétique de broyage

Le broyage étant opéré en continu, l'effet du débit est important notamment à cause de son impact sur la DTS. En fixant les autres paramètres (taux de remplissage, taille de billes et vitesse d'agitation), les débits ont été variés entre 45 et 210 ml.min⁻¹. Cette étude a été réalisée uniquement sur la biomasse de *C. vulgaris* car elle était disponible en grande quantité.

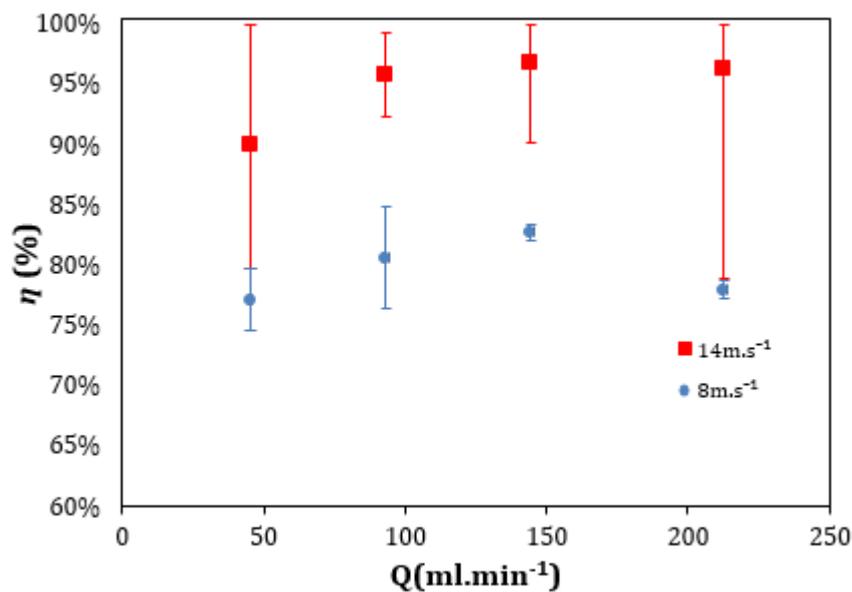


Figure 55 : Effet du débit sur le taux de destruction pour *C. vulgaris* pour un temps de séjour moyen de 5,3min (billes 0,375mm)

Les taux de destruction obtenus après un temps de séjour équivalent à ~5,3 min ont été comparés (Figure 55) : après un passage à 45 ml.min⁻¹ ; 2 passages à 93 ml.min⁻¹ ; 3 passages à ~145 ml.min⁻¹ et 4 passages à 210 ml.min⁻¹.

Les résultats montrent une légère augmentation du taux de destruction entre 45 ml.min⁻¹ et 93 ml.min⁻¹ et une diminution du taux de destruction entre 145 ml.min⁻¹ et 210 ml.min⁻¹ notamment à faible vitesse. Le taux de destruction relativement bas à faible débit est probablement lié à l'hydrodynamique dans le broyeur plutôt qu'à un changement dans la cinétique de destruction. En effet, pour des débits faibles la DTS a une dispersion plus importante (paragraphe 1.1) ce qui réduit l'efficacité du broyage. Par contre, la chute du taux de

destruction au débit maximal pourrait s'expliquer par l'apparition d'un tassement des billes vers le fond du broyeur (Kwade and Schwedes, 2007). Les débits que l'on peut conseiller pour ce broyeur avec les billes de 0,375 mm sont donc entre 100 et 150 ml.min⁻¹. Cette plage est susceptible de varier selon la taille et la densité des billes (Doucha and Lívanský, 2008).

3.2 Effet du diamètre des billes

L'effet du diamètre sur l'efficacité du broyage à billes semble complexe. En effet, si les billes sont très petites, leur inertie est plus faible et elles transmettent moins d'énergie aux particules lors des collisions. Par contre les billes trop grandes semblent être moins efficaces (Doucha and Lívanský, 2008; Mayerhoff *et al.*, 2008; Postma *et al.*, 2017).

Les résultats expérimentaux obtenus avec *P. kessleri* concernant les cinétiques globales (Figure 56.a) montrent une chute de l'efficacité des billes à partir de 0,9 mm, les billes de 0,375 mm et 0,625 mm ayant une efficacité équivalente à 14 m.s⁻¹. Les billes de 0,625 mm sont néanmoins plus efficaces à faible vitesse d'agitation. En observant les cinétiques par classe de taille (Figure 56.b et c), on constate que les cellules les plus grosses ont des cinétiques de destruction plus rapides que les cellules les plus petites. L'écart entre petites cellules et grosses cellules est marqué avec les billes de 0,625 mm. Cette taille de billes permet donc d'avoir une destruction sélective des grosses cellules par rapport aux plus petites.

En ce qui concerne les cellules de *C. vulgaris*, l'inefficacité des billes de 0,9 mm et 1,3 mm est à nouveau constatée (Figure 57). En revanche, il est évident que les billes de 0,375 mm sont les plus efficaces car autant pour les cinétiques par classes que pour la cinétique globale, les cinétiques sont plus rapides avec cette taille de billes. Cela confirme donc les résultats de (Postma *et al.*, 2017) obtenus avec des billes de zirconium (densité 6000 kg.m⁻³). Ces résultats prouvent que même avec des billes moins denses en verre (densité 2500 kg.m⁻³) la taille ~ 0,4 mm est optimale pour le broyage de *C. vulgaris*. Les billes de 0,375 mm sont également celles pour lesquelles la sélectivité entre petites et grosses cellules est la plus marquée.

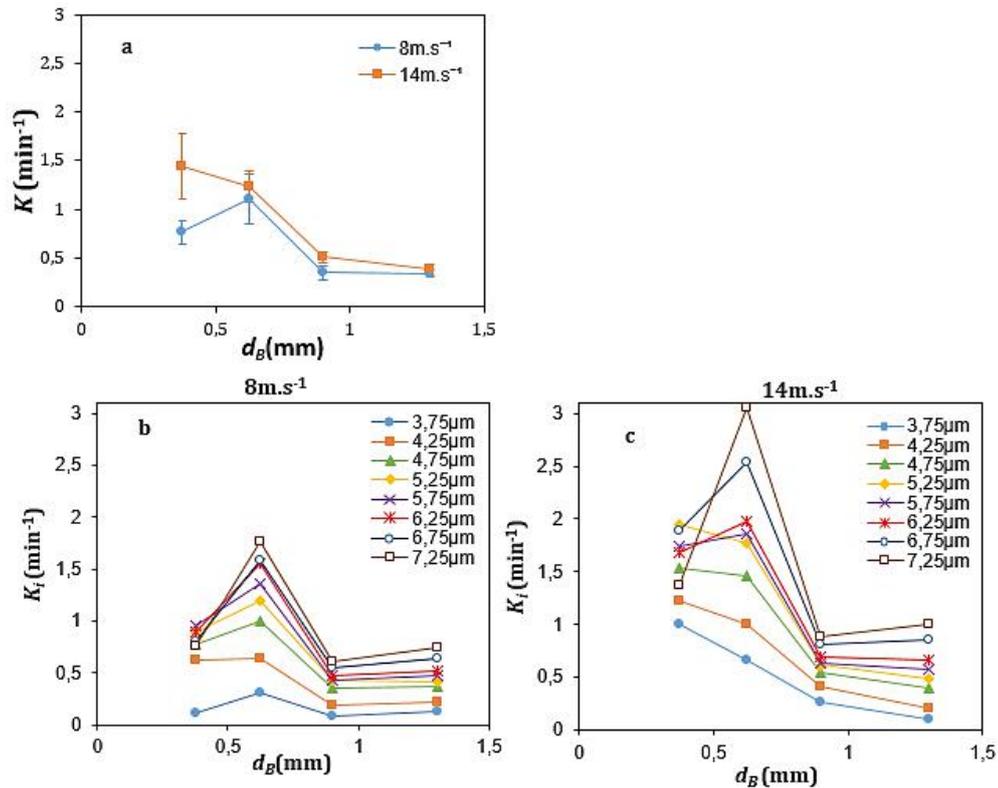


Figure 56 : Effet de la taille des billes sur la cinétique de destruction de *P. kessleri*. **a** constantes cinétiques globales en fonction de la taille des billes ; **b** (respectivement **c**) constantes cinétiques des classes de tailles en fonction de la taille des billes.

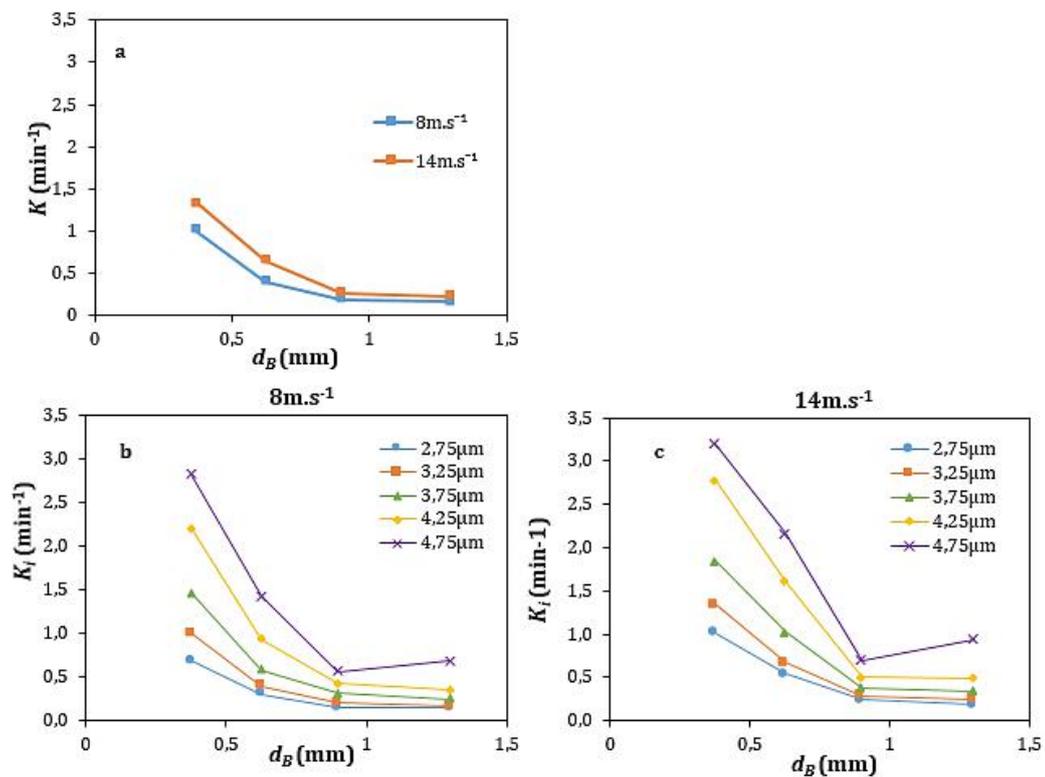


Figure 57 : Effet de la taille des billes sur la cinétique de destruction de *C. vulgaris* **a** constantes cinétiques globales en fonction de la taille des billes ; **b** (respectivement **c**) constantes cinétiques des classes de tailles en fonction de la taille des billes.

En résumé, les tailles de billes optimales et « granulo-sélectives » sont de ~0,6 mm et ~0,4 mm pour le broyage de *P. kessleri* et *C. vulgaris* respectivement. Il semble y avoir une corrélation entre taille/fragilité de cellules et taille optimale de billes. En effet, le diamètre moyen des cellules vaut 5,6 μm et 4,3 μm respectivement pour *P. kessleri* et *C. vulgaris*. La taille moyenne des cellules est donc ~100 fois plus petite par rapport à la taille optimale de billes.

En regardant les cinétiques par classes de *P. kessleri* (Figure 56 **b** et **c**), la taille de billes la plus efficace pour les cellules des classes supérieures à 6 μm (6,25 μm ; 6,75 μm et 7,25 μm) est 0,625 mm. Cela va dans le sens d'une corrélation entre taille de cellule et taille de bille optimale cette fois au sein d'une même espèce.

3.3 Effet de la vitesse d'agitation

L'augmentation de la vitesse d'agitation implique une augmentation de la vitesse des billes et aussi des gradients de vitesse tangentielle des billes. L'énergie des chocs et aussi leur fréquence sont simultanément accrues. Il en découle une augmentation de la cinétique de destruction observée expérimentalement pour les deux souches étudiées (Figure 58 et Figure 59). Les courbes de constantes cinétiques de destruction évoluent du bas vers le haut en augmentant la vitesse d'agitation du broyeur. Ce même constat a été fait expérimentalement autant pour le broyage de matériaux cristallins que pour le broyage de microorganismes (Schütte and Kula, 1988; Doucha and Lívanský, 2008; Jayasundara *et al.*, 2010; Toraman and Katircioglu, 2011).

Les résultats expérimentaux observés pour *P. kessleri* (Figure 58) et *C. vulgaris* (Figure 59) confirment l'effet positif de l'augmentation de la vitesse d'agitation sur l'efficacité du broyage.

L'augmentation de la cinétique de destruction avec la taille des cellules est à nouveau mise en évidence avec des courbes croissantes en fonction de la taille des cellules. La pente de ces courbes peut être utilisée comme indicateur du degré de sélectivité entre petites et grosses cellules engendré par les conditions de broyage. La pente des courbes augmente également avec la vitesse d'agitation.

Ainsi, une valeur maximale est atteinte pour les expériences à la vitesse maximale (14 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) avec les billes de 0,625 mm pour *P. kessleri* et les billes de 0,375 mm pour *C. vulgaris*.

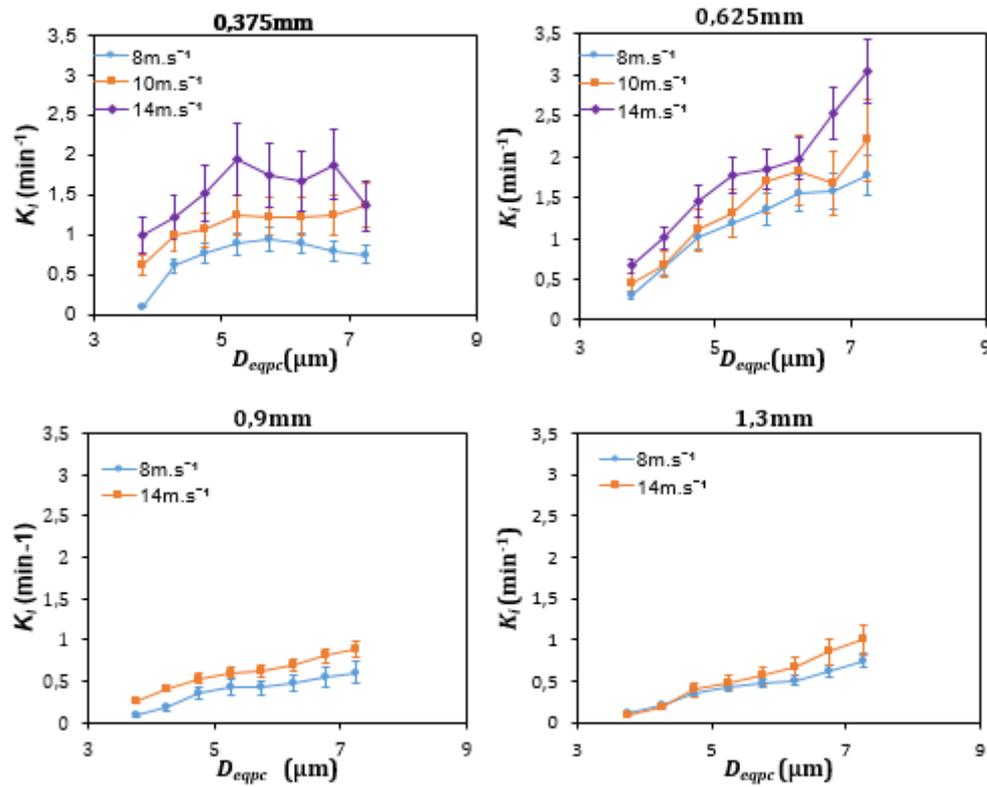


Figure 58 : Effet de la vitesse d'agitation et de la taille des cellules sur la cinétique de destruction de *P. kessleri*.

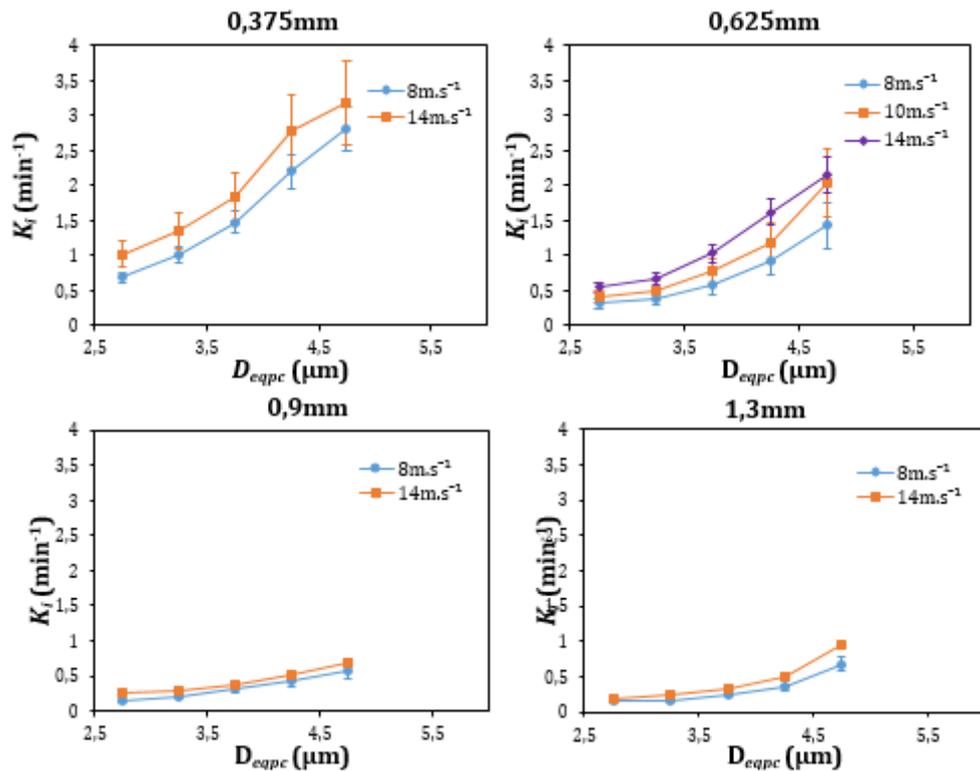


Figure 59 : Effet de la vitesse d'agitation et de la taille des cellules sur la cinétique de destruction de *C. vulgaris*.

3.4 Effet de la concentration des cultures

L'effet de la concentration des suspensions de microalgues a été étudié pour *C. vulgaris* à des concentrations entre 1 g.l⁻¹ et 30 g.l⁻¹, soit de 0,1 % à 3 % de matière sèche. Ces expériences sont faites avec les billes de 0,375 mm qui sont les plus efficaces pour le broyage de *C. vulgaris* selon les résultats de la section 3.2. Une première expérience a été faite avec un débit de 200 ml.min⁻¹ à 14 m.s⁻¹ (Figure 60. a). Pour cette expérience, il n'y a pas d'augmentation significative de la constante cinétique globale de destruction avec l'augmentation de la concentration en biomasse étant donné que les valeurs restent dans les marges d'incertitudes. Par contre, pour la seconde expérience faite à vitesse faible 8 m.s⁻¹ avec un débit à 150 ml.min⁻¹ (Figure 60. b), on constate une diminution de la constante cinétique de destruction autour de 27 g.l⁻¹. La chute de performance à faible vitesse avec l'augmentation de la concentration de microalgues semble être liée à l'hydrodynamique dans le broyeur et non à un changement de l'ordre de la cinétique de destruction. En effet, l'étude de la viscosité apparente de suspensions de *C. vulgaris* en fonction de la matière sèche a été faite par Souliès *et al.* (2013). Leurs résultats montrent qu'au-delà d'une concentration de 30 g.l⁻¹ les suspensions de *C. vulgaris* ont un comportement rhéofluidifiant. La concentration utilisée dans cette étude se rapproche de cette limite à partir de laquelle le comportement des suspensions s'écarte du comportement Newtonien. De plus, la présence de billes avec une fraction volumique dans le broyeur d'environ 0,54 (80% v/v de lit de billes d'une porosité ~0,33) complexifie encore plus le comportement du mélange.

NB : les valeurs de constantes cinétiques présentées ici ont été déterminées en utilisant un modèle de 2-RPA. Une estimation avec un modèle de DTS ajusté avec des suspensions concentrées aurait été plus appropriée. Des essais de mesure expérimentale de DTS avec des suspensions concentrées infructueux n'ont pas permis de conclure. En effet, le signal du conductimètre semble avoir été perturbé par la mousse formée pendant le broyage et par les ions libérés par le broyage des microalgues. Ainsi, pour une détermination plus précise de la DTS avec de fortes concentrations en biomasse (> 30 g.l⁻¹), un dosage du sel par chromatographie ionique avec un échantillonnage fréquent en sortie du broyeur serait plus approprié.

Néanmoins, en observant uniquement l'évolution du taux de destruction après un passage au broyeur en fonction de la MS (Figure 60. b), la baisse d'efficacité à 27 g.l⁻¹ est flagrante à 8 m.s⁻¹. Aucune évolution significative n'est observée à grande vitesse. L'effet de concentration semble être compensé par l'augmentation de la vitesse.

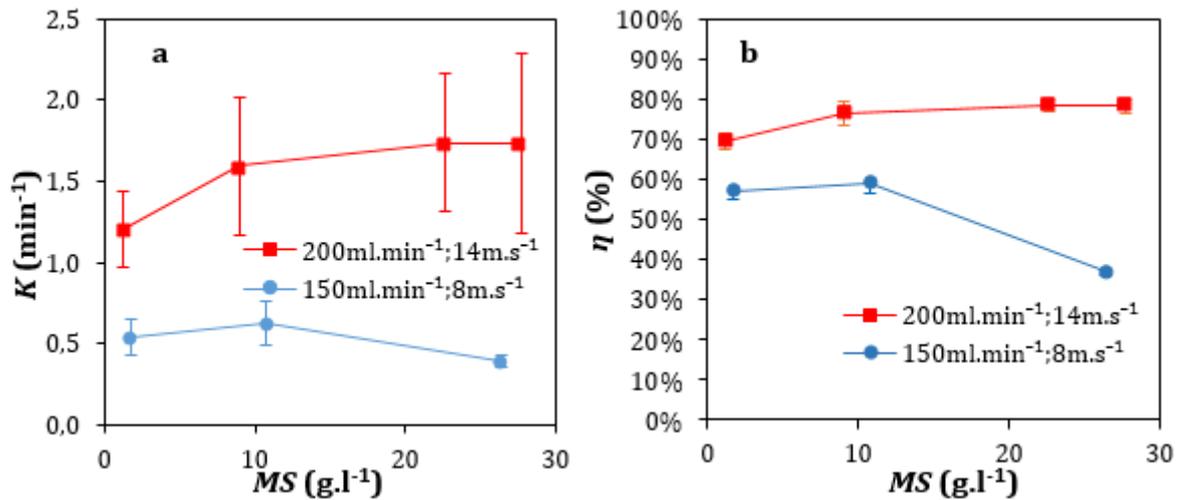


Figure 60 : Effet de la concentration en biomasse sur a la constante cinétique de destruction et **b** les taux de destruction après 1 passage pour *C. vulgaris* avec des billes de 0,375 mm

4. Modèle de Stress

4.1 Adaptation du modèle de stress au cas des microalgues

Le choix des paramètres opératoires du broyage à billes est complexe et nécessite plusieurs essais. En optimisant individuellement chaque paramètre le nombre d'essai est multiplié et la validation des résultats lors d'un changement d'équipement ou d'échelle n'est pas évidente.

Le modèle de stress décrit dans la section 3.2 du chapitre 1 a été développé initialement pour le broyage de matériaux cristallins et sera utilisé pour la modélisation de la destruction cellulaire. Pour qu'une cellule soit broyée, elle doit subir un évènement stressant avec une énergie suffisante pour vaincre sa résistance mécanique. Ainsi, le nombre de stress SN et l'énergie de stress SE fournis par le broyeur dans des conditions opératoires fixées peuvent permettre de prédire l'efficacité du broyage.

Les fréquences de stress et les énergies de stress sont des grandeurs qui sont distribuées dans le broyeur : en effet les zones près des disques et des parois sont celles où il y a plus de collisions entre billes, ce sont également les zones où l'énergie fournie au broyeur est le plus dissipée par les billes pour servir au broyage. Comme dans les cuves agitées, les grandeurs caractéristiques de ces distributions ont été estimées à partir des mécanismes prépondérants.

L'énergie de stress a été estimée en tenant compte des mécanismes de broyage. Les hypothèses principales qui ont conduit à une expression de l'énergie de stress sont :

- Le mécanisme prépondérant de broyage est le résultat des gradients de vitesses tangentielles élevées près des disques d'agitation (Kwade, 1999b)

- Seules des particules individuelles (et non des lits de particules) sont stressées suffisamment pour casser pour des suspensions diluées avec des particules plus grosses que 1 μm (Kwade, 1999a)
- La vitesse tangentielle des billes est proportionnelle à la vitesse périphérique des disques.
- Les collisions entre billes sont assimilées à des chocs élastiques et l'élasticité des microorganismes est négligée par rapport à l'élasticité des billes pour le broyage de microorganismes (Kwade and Schwedes, 2002).

Grâce à ces hypothèses, l'énergie maximale disponible pour le broyage des microorganismes est estimée proportionnelle à l'énergie cinétique maximale des billes :

$$SE \propto SE_B = \rho_B \cdot d_B^3 \cdot v^2 \quad (77)$$

Le nombre moyen de stress fourni par le broyeur est considéré proportionnel au nombre de contacts de billes N_c (-) qui est proportionnel à la fréquence d'agitation n (min^{-1}), au nombre de billes N_B (-) dans le broyeur et à la durée du broyage t (min) (temps de séjour moyen dans le broyeur en continu). La fraction du nombre moyen d'évènement stressants qui peuvent conduire à la rupture de cellules est donnée par la probabilité qu'un évènement stressant ait une énergie suffisante P_s .

$$SN = N_c \cdot P_s \quad (78)$$

$$N_c \propto N_B \cdot n \cdot t \quad (79)$$

$$N_B = \frac{\varphi \cdot (1 - \varepsilon)}{d_B^3} = \frac{\zeta}{d_B^3} \quad (80)$$

φ : le taux de remplissage en volume de la chambre de broyage

ε : la porosité du lit de billes

d_B (m) : le diamètre des billes

Les grandeurs φ (80 %) et ε (0,33) étant fixes au cours des expériences de cette étude, la constante ζ ($\sim 0,54$) sera utilisée dans la suite.

Pour le broyage de microorganismes, on considère que les contraintes de cisaillement entre les surfaces des billes sont suffisantes pour la rupture cellulaire (Kula and Schütte, 1987; Schwedes and Bunge, 1992). Une faible proportion de cellules est contrainte par les forces normales entre deux billes en collisions. Ainsi la probabilité que les évènements stressants soient assez intenses est considérée proportionnelle à la surface des billes (Kwade and Schwedes, 2002).

L'expression de SN devient alors d'après (78),(79) et (80) :

$$SN \propto n. t. \frac{\zeta}{d_B} \quad (81)$$

Dans cette étude, l'effet de la taille des cellules sur la probabilité que les événements stressants soient efficaces a également été introduit. D'après les résultats de la section 3.2, plus les cellules sont grosses, plus cette probabilité est élevée. Les plus grosses cellules ont donc plus de chance de se trouver dans une région où les contraintes sont suffisantes pour les broyer. Ainsi le diamètre d_μ des microalgues a été introduit dans l'expression du SN .

Deux hypothèses ont été proposées et évaluées expérimentalement pour retenir la plus adaptée :

- La probabilité que les événements stressants soient efficaces est proportionnelle à la surface des billes et à la taille des microalgues d_μ . L'expression de SN résultante est :

$$SN_1 \propto n. t. \zeta \frac{d_\mu}{d_B} \quad (82)$$

- Pour tous les événements stressants l'énergie est suffisante pour broyer une cellule indépendamment de la surface des billes ($P_s = 1$). L'effet de la taille des microalgues est alors introduite par un terme en d_μ^3 afin d'avoir une expression adimensionnelle :

$$SN_2 \propto n. t. \zeta \frac{d_\mu^3}{d_B^3} \quad (83)$$

Afin de vérifier ces hypothèses, une étude expérimentale du nombre de stress requis pour rompre 90 % des cellules pour différentes classes de tailles a été faite. Le temps nécessaire pour atteindre 90 % de destruction est calculé en utilisant les constantes cinétiques de destruction évaluées expérimentalement en tenant compte de la DTS. Le temps de séjour moyen nécessaire en mode continu pour atteindre un taux de destruction donné est calculé par la relation (84) déduite de l'équation (74)

$$t(\eta) = \frac{2}{K_i} \cdot \left(\sqrt{\frac{1}{1-\eta}} - 1 \right) \quad (84)$$

Les valeurs de SN_1 et SN_2 pour chaque classe de tailles ont été calculées pour les différentes conditions expérimentales testées.

4.2 Validation expérimentale des hypothèses

On constate pour les valeurs de $SN_{2,i}$ (Figure 61.b) calculées pour *C. vulgaris* que celles des petites cellules (2,75 μm) sont inférieures aux valeurs des plus grosses cellules (4,75 μm). Cette tendance ne reflète pas la réalité physique constatée dans la section 3.2 : les plus grosses cellules ont une cinétique de broyage plus rapide que les plus petites. Le nombre de stress requis pour casser les grosses cellules devrait donc être inférieur à celui des plus petites cellules. Les valeurs

de $SN_{1,i}$ obtenues quant à elles (Figure 61.a) respectent cette hiérarchie. L'hypothèse que P_s soit proportionnelle à la surface des billes et au diamètre des algues est donc cohérente avec les résultats expérimentaux. L'expression de SN décrite par l'équation (82) a donc été retenue pour la suite.

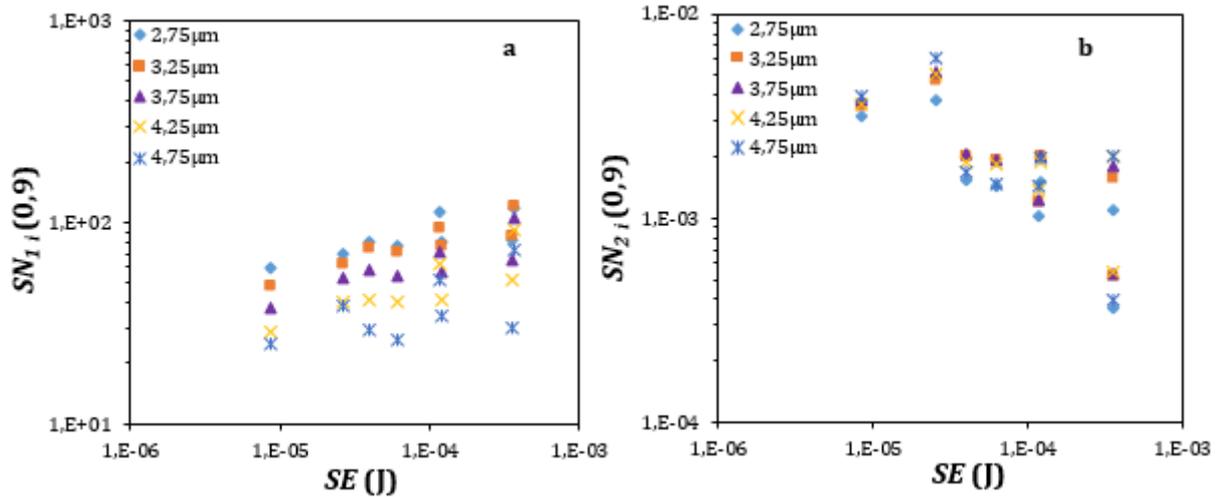


Figure 61 : Comparaison des valeurs expérimentales de : **a** $SN_{1i}(0,9)$ et **b** $SN_{2i}(0,9)$ pour chaque classe de taille des cellules de *C. vulgaris* en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur $SE(J)$

4.3 Application du modèle sur *C. vulgaris* et *P. kessleri*

4.3.1 Energie de stress optimale

Le calcul du nombre de stress requis pour casser 90 % des cellules des différentes classes de taille a été calculé pour *P. kessleri* et *C. vulgaris* (Figure 62). On constate que le nombre de stress requis semble relativement constant pour chaque classe de taille en particulier pour les cellules de *Chlorella* dont les valeurs sont moins dispersées. On n'observe pas l'apparition d'une valeur optimale de SE à partir de laquelle le nombre de stress requis diminuerait significativement comme décrit dans la bibliographie (section 3.2.2 du chapitre 1). Les conditions de broyage testées (billes en verre de 0,375 mm-1,3 mm, vitesses entre 8 m.s^{-1} - 14 m.s^{-1}) ne permettent probablement pas d'avoir des valeurs de SE suffisamment faibles, zone dans laquelle soit se trouver la valeur optimale de SE .

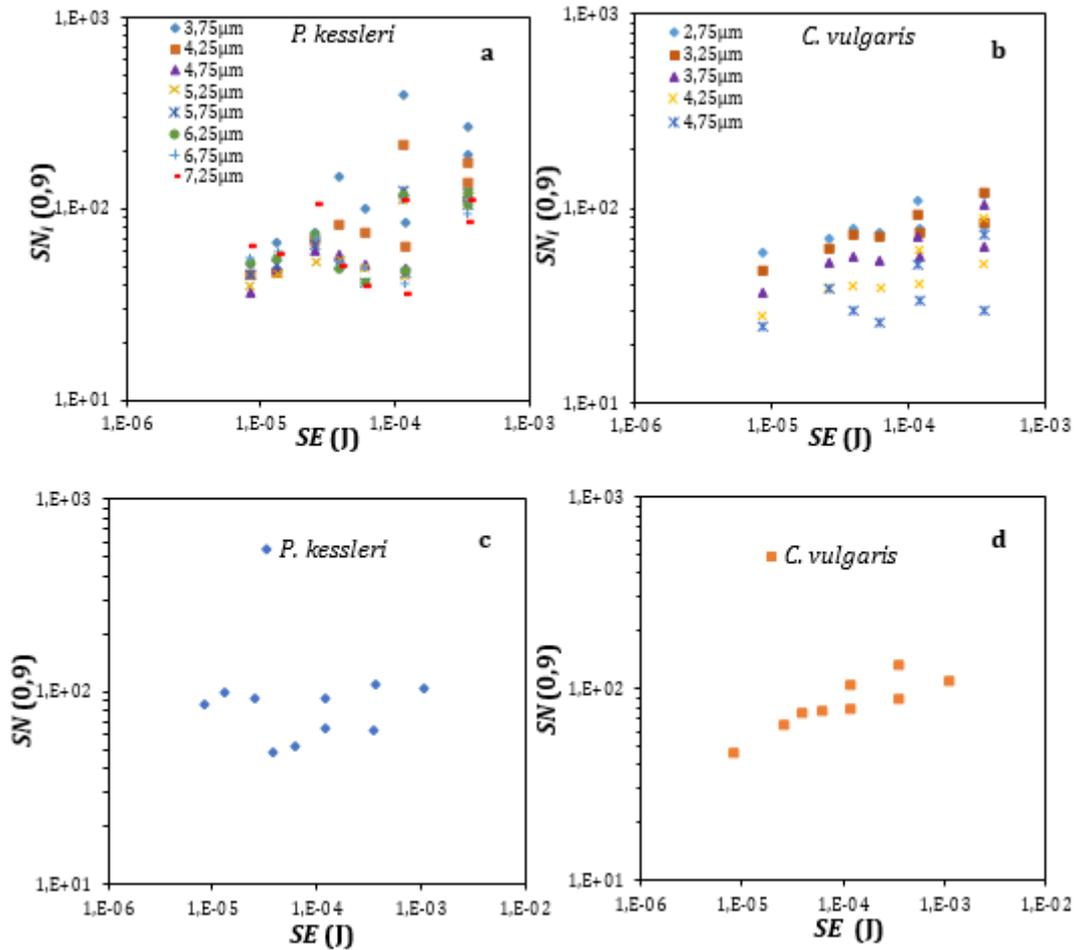


Figure 62 : Nombre de stress requis pour avoir un taux de destruction de 90 % pour chaque classe taille $SN_i(0,9)$ et pour la population globale $SN(0,9)$ des cellules de *P. kessleri* (a et c) et *C. vulgaris* (b et d) en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur SE (J)

Par ailleurs, étant donné que les différents tests ont été faits avec une même matière sèche pour chaque souche (culture stable de *P. kessleri* à $\sim 0,7$ g.l⁻¹ et même biomasse à $\sim 0,3$ g.l⁻¹ pour *C. vulgaris*), le produit $SE \cdot SN_i(0,9)$ des différentes expériences peut être utilisé pour comparer l'énergie spécifique consommée pour le broyage de 90% des cellules de chaque classe de taille. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 63.

On observe que l'énergie spécifique (proportionnelle au produit $SE \cdot SN(0,9)$) requise est une fonction croissante de l'énergie de stress. L'allure n'est pas en une cloche avec un minimum autour de la valeur de SE optimale comme pour le broyage de levures Figure 63.c. Pourtant, les ordres de grandeur d'énergie de stress testés (10^{-6} J – 10^{-3} J) sont bien plus bas que ceux utilisés pour les levures (10^{-4} J – 10J). Les conditions testées se situent probablement dans une zone où l'énergie de stress est supérieure à l'énergie nécessaire pour juste broyer les cellules des microalgues. Tous les événements stressants sont suffisamment intenses pour détruire les cellules. Une augmentation de l'énergie spécifique fournie au broyeur n'apporte donc pas plus

d'efficacité. Ce qui explique une augmentation de l'énergie spécifique proportionnelle à l'énergie de stress (pente 1 dans Figure 63.a et b). Dans cette plage, le taux de destruction ne dépend pas de l'énergie de stress mais du nombre de stress subis par les cellules.

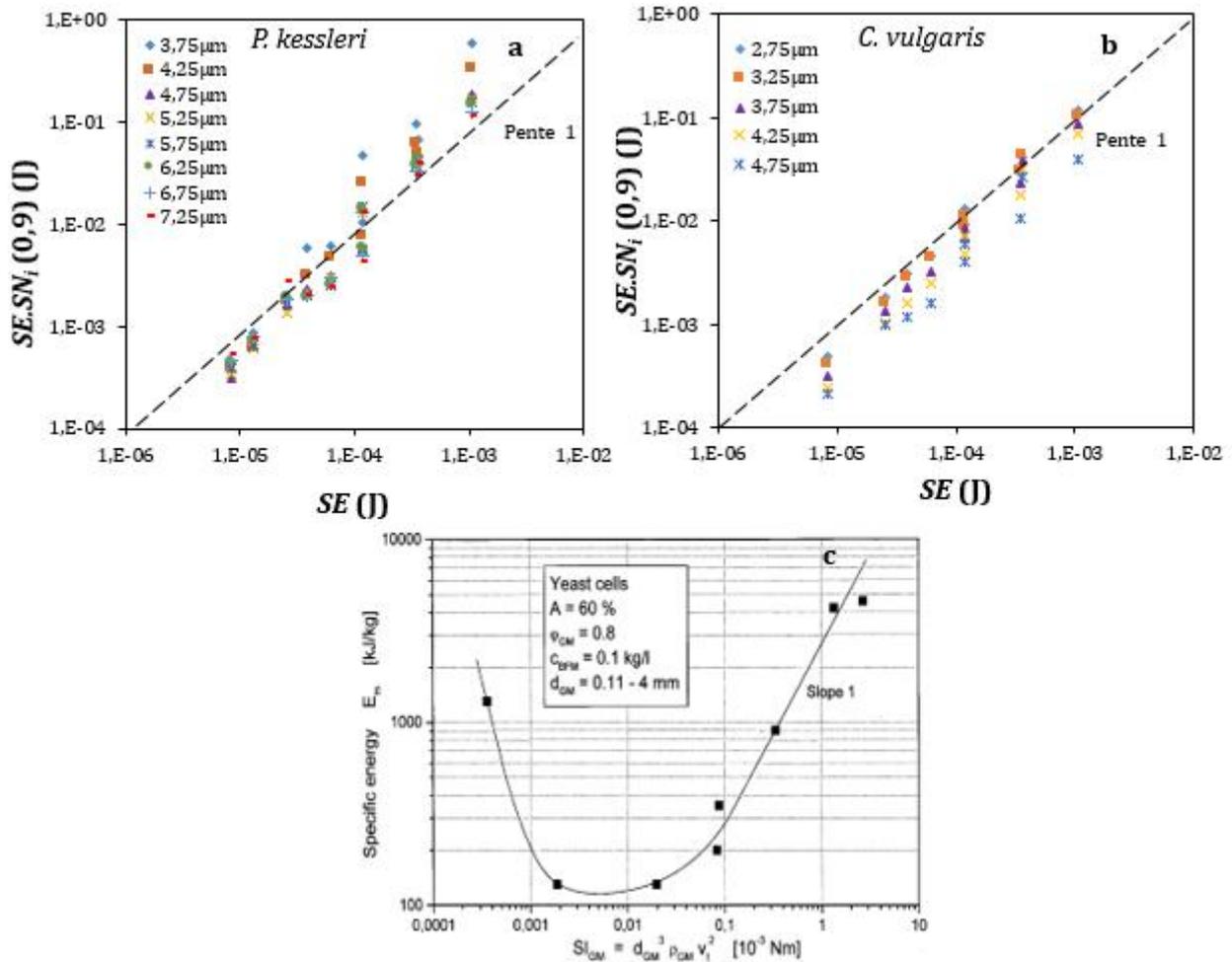


Figure 63 :a et b Produit $SE \cdot SN_i(0,9)$ par classe de taille des cellules de *P. kessleri* et *C. vulgaris* en fonction de l'énergie de stress dans le broyeur SE (J) ; c Energie spécifique consommée pour broyer 60 % des cellules de levures (Kwade and Schwedes, 2002)

4.3.2 Prédiction des constantes cinétiques

À la suite du constat que l'efficacité de destruction est indépendante de l'énergie de stress SE , une corrélation entre les constantes cinétiques de broyage et la fréquence de stress a été établie en Figure 64. En effet, le nombre de stress peut être écrit sous la forme

$$SN = SF \cdot t \quad (85)$$

$$SF \propto n \cdot \zeta \cdot \frac{d_\mu}{d_B} \quad (86)$$

Où SF est la fréquence de stress exprimée uniquement en fonction des paramètres opératoires du broyeur.

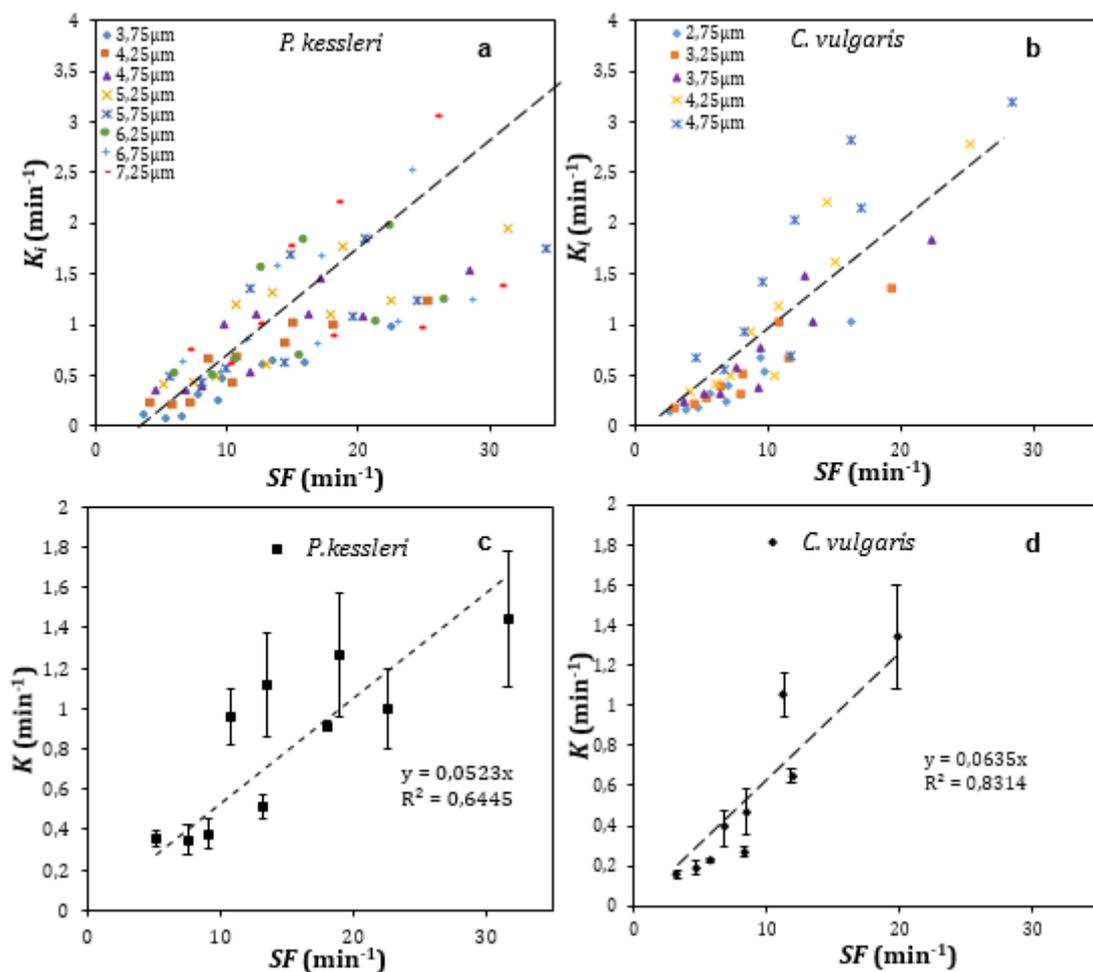


Figure 64 : Prédiction de la constante cinétique de destruction en fonction de la fréquence de stress SF pour *P. kessleri* et *C. vulgaris* : **a** et **b** constantes cinétiques de destruction par classe de taille ; **c** et **d** constantes cinétiques de destructions globales

Compte tenu des incertitudes expérimentales (jusqu'à 25 % d'incertitude relative), une assez bonne corrélation entre constantes cinétiques de destruction et fréquence de stress est obtenue. Ainsi dans la plage de conditions testées : billes de verre entre (0,375 mm et 1,3 mm), vitesses

d'agitation (8 m.s^{-1} - 14 m.s^{-1}) avec un taux de remplissage à 80 %, on peut prédire avec moins de 25 % d'erreur les constantes cinétiques globales de destruction en fonction de la fréquence de stress SF pour les deux microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri*.

4.3.3 Comparaison des fragilités de *C. vulgaris* et de *P. kessleri*.

Pour les mêmes conditions expérimentales (SE constant), les constantes cinétiques globales de *P. kessleri* étaient plus élevées que celles de *C. vulgaris* (Figure 65).

⇒ La microalgue *P. kessleri* est donc globalement plus fragile que *C. vulgaris* et est broyée plus rapidement.

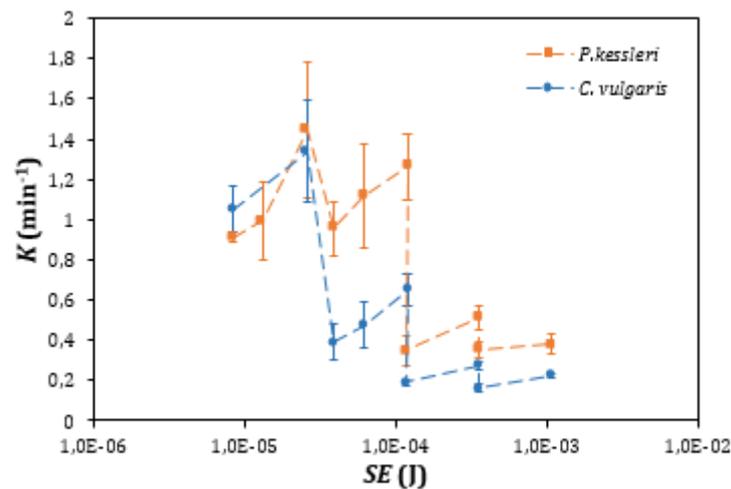


Figure 65 : Constantes cinétiques globales de destruction de *P. kessleri* et *C. vulgaris* en fonction de SE

Cependant, en considérant les résultats de la Figure 64.c et d, le facteur de proportionnalité de la constante cinétique globale avec SF pour *P. kessleri* (0,052) est inférieur à celui de *C. vulgaris* (0,063).

⇒ A taille équivalente, la microalgue *P. kessleri* est donc plus robuste que *C. vulgaris*.

En effet, lorsqu'on compare les constantes cinétiques pour les classes de tailles de $3,75 \mu\text{m}$, $4,25 \mu\text{m}$ et $4,75 \mu\text{m}$ communes aux deux microalgues, on constate que les constantes sont plus élevées pour *C. vulgaris*. Un exemple est présenté dans la Figure 66 pour la classe $4,25 \mu\text{m}$. Cela pourrait être attribué à la structure des parois des deux microalgues et par le fait que la paroi des cellules de *P. kessleri* ($54\text{-}69 \text{ nm}$) est plus épaisse que celle de *C. vulgaris* ($17\text{-}20 \text{ nm}$) (Yamamoto *et al.*, 2005).

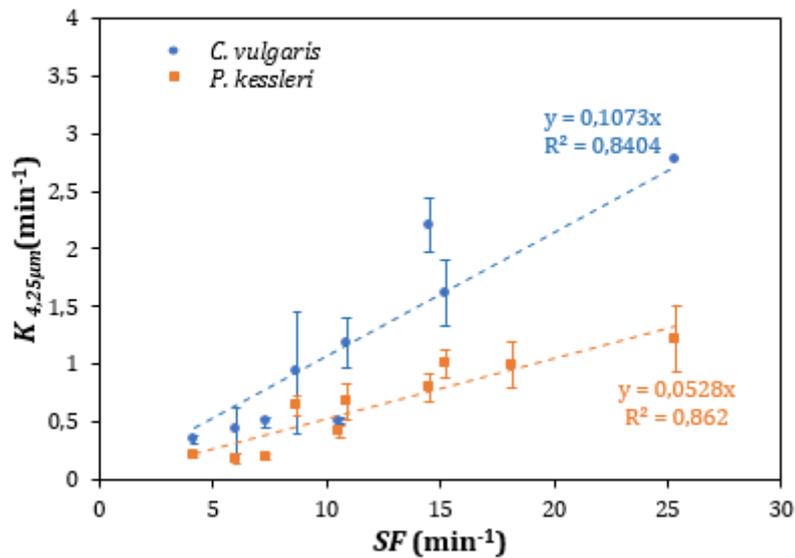


Figure 66 : Constantes cinétiques de destruction de la classe de taille 4,25 µm de *P. kessleri* et de *C. vulgaris* en fonction de *SF*

4.4 Conditions de libération sélective des protéines et de la chlorophylle a

Le broyage à billes de microalgues a pour finalité la libération de molécules d'intérêt. Pour faciliter la séparation et la purification de ces molécules, il est intéressant d'avoir une sélectivité dans la libération des différentes biomolécules pendant la lyse cellulaire. Pour déterminer les conditions permettant d'avoir une meilleure sélectivité, les protéines solubles ont été utilisées comme marqueur cytoplasmique et la chlorophylle a comme marqueur chloroplastique. Dans les conditions testées pour *P. kessleri*, l'indice de sélectivité de la libération des protéines défini dans l'équation (87) a été calculé pour le deuxième passage de chaque condition. En effet, les protéines sont libérées relativement rapidement avec un taux évoluant peu après le deuxième passage.

$$I_s = \frac{\eta_p(2)}{\eta_{chl a}(2)} \quad (87)$$

$\eta_p(2)$ et $\eta_{chl a}(2)$ correspondent respectivement aux taux de libération des protéines et de la chlorophylle a après le deuxième passage au broyeur (temps de séjour moyen de 2,6min).

Les résultats présentés en Figure 67 mettent en évidence une inversion de l'évolution de la sélectivité et du taux de libération des protéines :

- pour des *SE* faibles (petites billes), le taux de libération des protéines est élevé et atteint un maximum de 90 % pour les billes de 0,375 mm à 14 m.s⁻¹ puis chute à une valeur de 50 % pour les *SE* élevées (billes de 1,3 mm) ;

- la sélectivité quant à elle a une tendance inverse et est maximale pour les valeurs de SE élevées. La zone intermédiaire correspondant aux billes de 0,625 mm à 0,9 mm (SE entre 4.10^{-5} et 4.10^{-4} J) constitue un compromis entre sélectivité et taux de libération ;
- Le meilleur compromis est obtenu pour les billes de 0,625 mm à vitesse modérée (10ms^{-1}). Avec cette condition, le taux de libération des protéines 65 % et l'indice de sélectivité sont autour de 6,5 correspondant à une SE de $6,1.10^{-5}$ J. On constate également qu'opérer à vitesse modérée favorise généralement la sélectivité.

Les billes de 0,375 mm à 8ms^{-1} offrent un compromis intéressant (taux de libération de 65 % avec un indice de sélectivité 5) d'autant plus que cette condition est celle qui minimise la consommation spécifique d'énergie d'après les résultats de la section 4.3.1 pour *P. kessleri*.

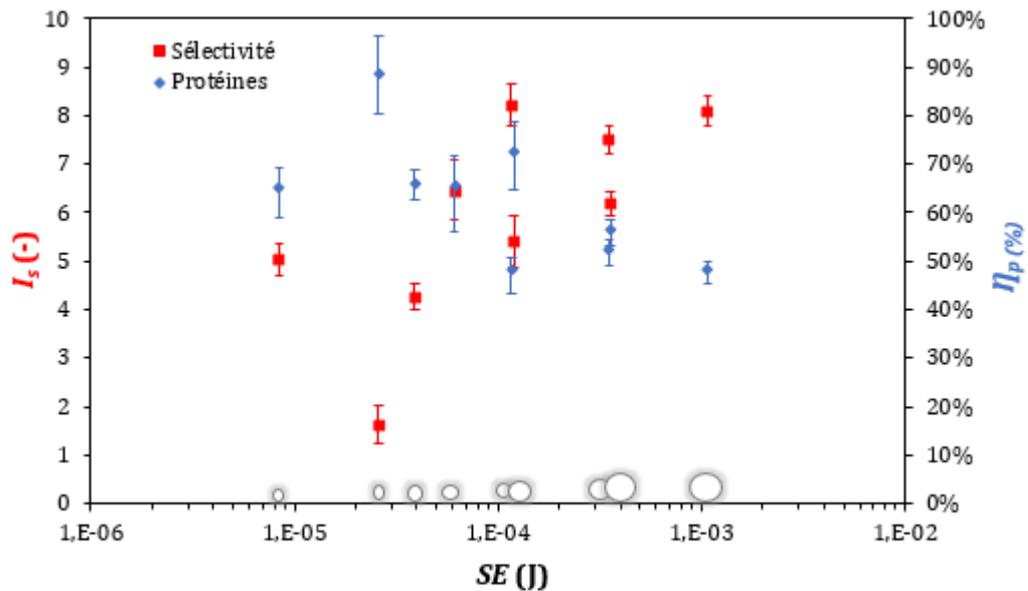


Figure 67 : Sélectivités et taux de libération des protéines de *P. kessleri* en fonction de l'intensité de stress SE (J) : chaque valeur de SE représente une condition ; les sphères représentent les tailles de billes correspondantes (0,375 mm-1,3 mm)

CONCLUSION

L'étude de la DTS dans le broyeur a montré que le modèle de cascade de **n-RPA avec recirculation** avec le nombre de RPA fixé par le nombre de disques d'agitation est **le plus approprié pour modéliser l'hydrodynamique** du broyeur d'étude. Dans les gammes de conditions expérimentales testées l'utilisation du modèle 2-RPA apporte cependant une précision équivalente au modèle avec recirculation dans l'estimation des constantes cinétiques de destruction. La méthode expérimentale d'étude de la DTS par conductimétrie a cependant montré ses limites pour les suspensions concentrées ($>30 \text{ g.l}^{-1}$). Il a donc été suggéré de doser le sel par chromatographie ionique avec un échantillonnage fréquent à la sortie à l'avenir.

L'étude paramétrique du broyage à billes des microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri* a permis de mettre en évidence les principaux résultats suivants :

- Le choix du **débit** de fonctionnement doit être fait de manière à avoir une DTS la plus étroite possible pour maximiser l'efficacité du broyage représentée par le taux de destruction. Pour le broyeur d'étude, un intervalle entre **100-150 ml.min⁻¹** est recommandé.
- Le diamètre des billes doit être choisi selon l'espèce de microalgues étudiée. Une taille de billes de l'ordre de **100 fois la taille moyenne** des cellules est recommandée pour les algues testées pour un **broyage rapide et granulo-sélectif**. Le choix du diamètre optimal est plus évident à faible vitesse. Il pourrait cependant être nécessaire d'augmenter la densité des billes pour le broyage de microalgues très rigides (parois très épaisses).
- L'augmentation de la vitesse permet d'améliorer les performances de broyage. Un compromis doit donc être fait entre consommation énergétique et efficacité du broyage.
- L'augmentation de la concentration en biomasse jusqu'à 30 g.l^{-1} n'a pas eu d'impact sur les performances de broyage sauf à faible vitesse. Cela pourrait être dû au comportement rhéologique rhéofluidifiant des microalgues à forte concentration. Le choix du couple concentration de suspension et vitesse d'agitation à utiliser doit permettre de minimiser la consommation énergétique spécifique (par unité de masse traitée) pour un taux de destruction désiré.

L'adaptation du modèle de stress au broyage des microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri* a permis de valider la proportionnalité de la probabilité qu'un événement stressant soit efficace avec la surface des billes et le diamètre des microalgues. Dans les conditions testées, **l'optimum énergétique** correspondait aux conditions offrant des énergies de stress **SE les plus petites** ($0,375 \text{ mm}$ à 8 m.s^{-1}) car les valeurs de *SE* étaient déjà supérieures au *SE* optimum.

Une relation de **proportionnalité** entre **constantes cinétiques** de destruction et **fréquences de stress** a pu être établie. La culture de *P. kessleri* est globalement plus fragile que celle de *C. vulgaris*, mais à taille équivalente les cellules de *P. kessleri* sont plus rigides.

Les **conditions optimales** en termes de récupération **sélective de protéines de *P. kessleri*** sont avec **les billes de 0,625 mm à 10 m.s⁻¹**. Même si cette condition ne correspond pas à l'optimum de consommation énergétique, ce choix peut être justifié par la réduction éventuelle de consommables dans les étapes de fractionnement et de purification des protéines en aval.

- ⇒ D'une façon générale, une **cinétique** de destruction la plus **rapide** ne **correspond pas** forcément à un **optimum énergétique** ni à un **optimum pour la libération sélective** de métabolites.
- ⇒ Le choix des conditions optimales pour la valorisation d'un métabolite doit se faire en combinant les étapes de libération par destruction cellulaire et les étapes de fractionnement qui seront à enchaîner ensuite.

Chapitre 5: Bead milling disruption kinetics of microalgae: process modeling, optimization and application to biomolecules recovery from *Chlorella sorokiniana*

Résumé :

Dans ce chapitre, le modèle de stress adapté aux microalgues et prenant en compte la taille des cellules est utilisé pour la prédiction des cinétiques de destruction de la microalgue *Chlorella sorokiniana*. La séparation de l'amidon, des protéines et de la chlorophylle avec des conditions de centrifugation douce a été étudiée. Le modèle de stress est utilisé pour choisir des conditions de broyage optimales pour le fractionnement de l'amidon, des protéines et de la chlorophylle.

Le chapitre est présenté sous sa forme d'article publié et a été réalisé en collaboration avec Imma Gifuni, doctorante de l'Université Federico II à Naples, qui travaillait sur la valorisation de l'amidon par bioraffinage de microalgues (Zinkoné et al. 2018).

INTRODUCTION.....	139
1. Materials and methods.....	141
1.1 Microalgal strain and culture.....	141
1.2 Disruption modeling.....	142
1.3 Centrifugation	145
1.4 Analysis of the recovered products.....	146
2. Results and discussion	147
2.1 Biomass composition	147
2.2 Evolution of the size distribution during bead milling.....	147
2.3 Effect of bead size and agitation speed on the overall disruption kinetics...	148
2.4 Effect of cell size on the disruption kinetics	148
2.5 Stress model applied to each size class.....	149
CONCLUSION	154

INTRODUCTION

Microalgae are considered as a sustainable alternative feedstock for different industrial fields: food, feed, fuels, bioactive molecules (Chisti, 2008; Draaisma *et al.*, 2013; Wijffels *et al.*, 2010). The challenges for industrial development are still numerous. For high yield and robust large-scale production, the biomass characterization and the modeling of growing conditions are required. After that, the downstream processing (DSP) has to be developed with the aim of valorization of different fractions for a cost-effective process (Asyraf Kassim *et al.*, 2017; Chew *et al.*, 2017; Moreno-Garcia *et al.*, 2017). Downstream unit operations are harvesting, cell disruption, phase's separation, extraction and purification. The costs for DSP using currently available technologies, represents more than 50% of the overall exploitation costs. Therefore, optimization, intensification and step reduction in this field, are the priority issues (Davis *et al.*, 2011; Molina Grima *et al.*, 2003).

For the recovery of both hydrophilic and hydrophobic microalgal compounds, the wet route processing (no preliminary drying) is the most adopted strategy, and it starts with the protein and polysaccharides release in an aqueous phase. The wet route reduces the process cost due to dewatering. In such a process scheme, the different fractions yield and purity are highly influenced by the method used for their release from the cells (Angles *et al.*, 2017). In this sense, the cell disruption is a crucial step as well as other pretreatment operations in biorefinery schemes.

Mechanical cell disruption in particular bead milling is a promising technique for industrial scale application due to its efficiency of disruption and the commercially available devices at large scale (Günerken *et al.*, 2015). The main drawbacks are the high energy demand, the heat production (cooling is necessary) and a complex product release in the lysate. Indeed, extreme bead milling disruption produces lysates, characterized by the production of very small cell debris and consequent molecular aggregations which are difficult to separate. Therefore, mild cell disruption conditions should be adjusted to minimize these drawbacks and to preserve the integrity of the released molecules (Phong *et al.*, 2017). A modeling of the cell disruption mechanisms considering the bead milling operating conditions and the specificities of microalgae, is then necessary.

Several studies were addressed to the description of the process from the mathematical point of view to find the main parameters for the optimization. In particular, cell disruption kinetics was successfully described with a first order kinetics model by Garrido *et al.* (1994) Balasundaram *et al.* (2011); Kwade and Schwedes (2007). This model was recently transposed from yeast to microalgae disruption (Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2017).

Montalescot *et al.* (2015) used stress models coupled with the bead miller hydrodynamics modeling to describe cell disruption and the energy input as function of the process parameters. A critical stress intensity corresponding to the optimal parameters to balance efficient disruption and efficient energy use was identified.

Moreover, the comparison of the disruption behavior of different microalgae species (Montalescot *et al.*, 2015; Postma *et al.*, 2017) revealed that disruption kinetics in bead milling is strain-related. The differences between the strains were attributed to cell size, and to the composition and rigidity of cell membrane and cell wall. In non-synchronized cultures, microalgal cells are normally distributed in different size classes corresponding to different growth stages. The study of synchronized cultures (de Winter *et al.*, 2013) proved that during growth phase cells become bigger and accumulate first pigments and proteins, and then energy storage metabolites such as lipids and starch until the division step. After division, cells are smaller with obviously lower product content. The rigidity of cell membrane is also reduced in big cells and easier disruption can be expected but no experimental evidence was reported yet. As cell composition and rigidity varies with their size, a possible prediction of the disruption kinetics according to cell size and to the process parameters should open the way for an effective optimization of the disruption process.

The aim of the present study is to identify a relation between the bead milling parameters and: I) the kinetics of disruption for different cell size classes; II) the purity for specific cell metabolite release. To this end, the first order kinetics model was evaluated for describing the cell disruption of each cell size classes. The effects of the operating parameters were studied. The stress model was modified and implemented for interpolation and extrapolation purposes. Mild centrifugation was then used to settle part of the non-soluble particles and to study the purity of biomolecules release in the water phase. Centrifugation conditions were chosen to ensure low energy investment and compatibility with low-cost and large-scale equipment. The partitioning of proteins, pigments and starch between pellet and supernatant was related to the bead milling parameters.

1. Materials and methods

1.1 Microalgal strain and culture

Disruption experiments were performed in Dyno-mill multi lab from Willy A Bachofen AG (Muttenz, Switzerland). The bead milling was operated in pendulum mode as already described by Montalescot *et al.* (2015). The temperature was maintained below 20°C, the flow rate was set at 200 ml.min⁻¹ and the filling ratio of the grinding media at 80%. Bead density (glass, zirconia), bead diameter (0.2–1.3mm) and the impeller tip velocity (8–14 m.s⁻¹) were varied in order to test different stress intensities referred to the stress model.

Cell counting and cell size distribution were performed at process outlet, for each pass in the bead mill, using image analysis with the software Image J (1.50b, Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). At steady state, (after 3 chamber's volumes) 10 ml of sample was collected. Cells were then fixed with 20 µmol of Lugol's iodine per ml of sample to enhance the contrast. The sample was placed in two Malassez counting plates and analyzed by a Carl Zeiss optical microscope equipped with an Axioscope A1 camera. 50 pictures were taken on the gridded areas of the Malassez plates (25 pictures/plate). The camera settings were kept identical for each sample. The 50 images were treated simultaneously applying: a) a conversion to 8 bits images; b) a thresholding into white and black and particle analysis. The thresholding levels were calibrated to have a deviation lower than 10 % with manual counts of 5 pictures picked randomly. For particle analysis, the ratio between pixels and real size was 4 pixels.µm⁻¹. Particle size and shape were the criteria to differentiate non-disrupted cells from cell debris. For this purpose, the equivalent spherical diameter (D_{ESD} : diameter of an equivalent sphere which has the same area of projection as the particle) and the circularity (Circ: ratio between the particle perimeter and the perimeter of a sphere with the D_{ESD}) were used as filters to characterize size and shape:

$$D_{ESD} = 2 \times \sqrt{\frac{A}{\pi}} \quad (88)$$

$$Circ = 4 \times \frac{A}{\pi D_{ESD}^2} \quad (89)$$

with A the projection area of the particle.

To set the ranges of these filters, the size and the shape of intact cells at the steady state of the culture were analyzed. The cells sizes were between 2.5 and 8µm with a mean circularity of 0.93. The ranges of the filters were chosen to select most of the non-disrupted cells in the lysates without counting cell debris. The selected ranges were: $2.5 < D_{ESD} < 10\mu\text{m}$ and $Circ \geq 0.85$. The cell size distribution was divided into 0.5µm wide size classes. The disruption rate was calculated for each pass using the following equations:

$$\eta_j(i) = 1 - \frac{N_j(i)}{N_0(i)} \quad (90)$$

$$\eta_j(i) = 1 - \left(1 - \eta_j(i)\right)^j \quad (91)$$

$\eta_j(i)$: the disruption rate after the j^{th} pass in the bead mill

$N_j(i)$: the number of non-disrupted cells of the size class i per ml of the lysate after the j^{th} pass in the bead mill

$N_0(i)$: the initial number of cells per ml of the class i in the microalgal suspension

1.2 Disruption modeling

1.2.1 Hydrodynamics and kinetics considerations

The cell disruption kinetics was modeled as a first order model for the overall population and for each size class. Concerning the process hydrodynamics, the two-continuously stirred tank reactors in series (CSTR) was used for the residence time distribution modeling as demonstrated in (Montalescot *et al.*, 2015) for the same equipment. The mass balance at the steady state of the continuous operation is written through (92) and (93) for the two CSTRs:

$$QN_0(i) = QN_1(i) + K_i N_1 \frac{V}{2} \quad (92)$$

$$QN_1(i) = QN_2(i) + K_i N_2 \frac{V}{2} \quad (93)$$

$N_0(i)$ (respectively $N_1(i)$) represents the number of cells of the class i per ml at the entrance of the first (respectively second) CSTR.

$N_1(i)$ (respectively $N_2(i)$) represents the number of cells of the class i per ml at the exit of the first (respectively second) CSTR.

V (ml) the free volume in the bead milling chamber.

Q (ml.min⁻¹) the flowrate of the microalgal suspension.

K_i (min⁻¹) the disruption kinetics constant for the size class i .

The combination of (92)and (93) allows the calculation of the disruption rate $\eta_1(i)_{mod}$ of the first pass using (7)

$$\eta_1(i)_{mod} = 1 - \left[\frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau_p}{2}\right) \times K_i\right)^2} \right] \quad (94)$$

with τ_p : the mean residence time equals to the ideal filling time (ratio between the free available volume in the grinding compartment and the volumetric flow rate) for a cascade of CSTRs in series.

The modeled $\eta_j(i)mod$ expressions for the following passes ($j>1$) are deduced from $\eta_1(i)mod$ using (4).

The experimental $\eta_j(i)exp$ and modelled $\eta_j(i)mod$ were fitted by minimizing the cumulative square error defined in (95) to calculate K_i .

$$\varepsilon^2 = \sum_{j=1}^n (\eta_j(i)exp - \eta_j(i)mod)^2 \quad (95)$$

1.2.2 Stress model

Kwade and Schwedes (Kwade, 1999a, 1999c; Kwade and Schwedes, 2007) developed stress models to describe the influence of the operating conditions in wet stirred media mills on the comminution of crystalline materials and yeast disruption. These models have been successfully extended to the disruption of microalgae by (Montalescot *et al.*, 2015) and (Postma *et al.*, 2017). The cell disruption rate during bead milling depends both on how frequently particles are stressed and how intense are the stressing events. In this sense, the effect of the bead milling operating parameters has been combined in 3 parameters:

- the stress intensity SI (J), the energy available at each stressing event for disruption;
- the stress number SN (-), the number of efficient stressing events (number of bead collisions with enough intensity to break particles);
- the specific energy E_m ($J \cdot kg^{-1}$), amount of provided energy per product dry matter unit.

According to the stress model, when two of the three parameters are fixed independently of the corresponding set of operating parameters (impeller tip velocity, bead size and density, milling time...), the quality (disruption rate or product fineness) of the product during wet grinding is the same. The real stress intensities and stress numbers distributions in the grinding chamber can only be obtained by complex numerical calculations combining the flow field and beads motion (Blecher and Schwedes, 1996; Beinert *et al.*, 2015). Nevertheless, characteristic values of SI and SN based on the grinding mechanisms have been proposed and allowed the description of the influence of the bead milling operating parameters on the disruption efficiency. The SI value has been expressed assuming that:

- the most intense and frequent mechanism of disruption is the result of the collision of beads due to high gradients of tangential velocity near the stirrer (Kwade, 1999a);
- only single particles are stressed between two colliding beads for particles larger than $1\mu m$ in low solid concentration suspensions (when particles have enough freedom of motion) (Kwade, 1999a);
- the tangential velocity of the grinding media is proportional to the tip velocity of the impellers;

- the collision of bead to particle collisions are assimilated to elastic impacts (Becker *et al.*, 2001) and the elasticity of the feed materials much smaller than that of the grinding media in cases of deagglomeration, cell disintegration and grinding of weak or medium hard crystalline materials (Kwade and Schwedes, 2002).

Therefore, the maximal stress energy available for disruption is proportional to the maximal kinetic energy of the grinding media.

$$SI_{max} \propto SE_B = \rho_B \cdot d_B^3 \cdot v^2 \quad (96)$$

With ρ_B (kg.m⁻³), d_B (m) and SE_B (J), the density, the diameter and the stress energy of the beads respectively and v (m.s⁻¹) the tip velocity of the impellers.

SN was assumed to be proportional to the number of contacts N_c (-) and the probability that a particle is sufficiently stressed during one stressing event P_s (-).

$$SN = N_c \cdot P_s \quad (97)$$

Where $N_c \propto n \cdot t \cdot N_B$, n the number of stirrer revolutions per second, t the milling time and N_B the number of beads.

Kula and Schütte (1987) and Schwedes and Bunge (1992) showed that for microorganisms disintegration shear forces of the fluid between two colliding beads are sufficient for disruption and then that P_s is proportional to d_B^2 .

Combining all these hypotheses, SN should be expressed as:

$$SN \propto \varphi \cdot (1 - \varepsilon) \cdot \frac{n \cdot t}{d_B} \quad (98)$$

ε (-) the bulk porosity of the beads, φ (-) the filling rate of the mill chamber, n (s⁻¹) the number of revolutions of the impeller per second.

The number of stress is commonly reported to the number of particles which is a parameter that decreases during the process. Here the expression of SN represents the total number of stress.

In the present study, the disruption behavior is detailed for each size class of cells and the effect of cell size was included in the SN definition. Two expressions for SN were compared:

$$SN_1 = SF_1 \cdot t \propto \zeta \cdot n \cdot t \cdot \frac{d_\mu}{d_B} \text{ with } SF_1 \propto \zeta \cdot n \cdot \frac{d_\mu}{d_B} \quad (99)$$

$$SN_2 = SF_2 \cdot t \propto \zeta \cdot n \cdot t \left(\frac{d_u}{d_B}\right)^3 \text{ with } SF_2 \propto \zeta \cdot n \cdot \left(\frac{d_u}{d_B}\right)^3 \quad (100)$$

$$\text{And } \zeta = \varphi \cdot (1 - \varepsilon) \quad (101)$$

In $SN_1(99)(12)$ the hypothesis that P_s is proportional to d_B^2 is maintained whereas for $SN_2(100)$ implies that at any media contact a cell is disrupted ($P_s = 1$). d_μ and d_μ^3 respectively are implemented in the definitions to describe the effect of cell size with dimensionless expressions. $SN_{i_1}(0.9)$ and $SN_{2_i} = (0.9)$ respectively are the required number of stress events to reach 90% of disruption in the size class i . The required residence time to reach 90% $t_i(0.9)$ that includes hydrodynamics and kinetics modeling was calculated with (102) as a function of the kinetic constants K_i (from experiments).

$$t_i(0.9) = \frac{2}{K_i} \cdot \left(\sqrt{\frac{1}{1-0.9}} - 1 \right) \quad (102)$$

SI is the specific energy consumed at each stress event and consequently the product $SI \cdot SN$ is proportional to the treatment specific energy E_m ($J \cdot kg^{-1}$). The proportionality factor is constant here due to the constant dry weight of the biomass ($1 \text{ g} \cdot l^{-1}$) used in the different disruption tests.

$$E_m \propto SI \cdot SN \quad (103)$$

1.3 Centrifugation

The microalgal lysate generated by bead milling was centrifuged before carrying out the analysis of the released products. Centrifugation parameters were selected to ensure the efficient settling of dense and insoluble particles (such as starch) and minimum energy consumption. Mild centrifugation at 2500g was selected as optimal speed for low cost large-scale applications. The time necessary to settle starch granules (dense and insoluble) was calculated according to:

$$t = \frac{9H\eta_L}{2(\rho_P - \rho_L)r_P^2g} \quad (104)$$

with $t(s)$ the time to achieve the starch settling, $H(m)$ the radial movement covered by the particles, $\eta_L(Pa \cdot s)$, the lysate viscosity $\rho_P(kg \cdot m^{-3})$ and $\rho_L(kg \cdot m^{-3})$ the densities of the starch particles and the density of the lysate respectively, $r_P(m)$ the mean diameter of microalgal starch granules; g ($m \cdot s^{-2}$) the centrifugal acceleration. The microalgal lysate was assumed to have

physical properties close to water since it was characterized by low cell concentration (Montalescot *et al.*, 2015; Souliès *et al.*, 2013). The properties of the microalgal starch granules were previously reported in Gifuni *et al.* (2017). The calculated time was 3 minutes, for the settling of starch granules suspended in 3 ml of lysate.

1.4 Analysis of the recovered products

After disruption and centrifugation, two fractions were obtained: pellet and supernatant. The dry matter, starch, proteins and pigments were quantified in the two fractions.

The dry matter in the pellet was measured by weighting the pellet after drying at 100°C for 24 hours. The dry weight of the total biomass was measured by filtering a known amount of culture by cellulose filter, then dried at 100°C for 24 hours and weighted. The dry matter released in the supernatant was calculated as difference from the total dry weight of the biomass.

The starch concentration was assayed in the pellet by Total Starch Kit by Megazyme (Wicklow, Ireland). Proteins concentration was assayed in the supernatant by BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Pigments concentration was measured in the pellet by spectrophotometric quantification after methanol extraction (Kandilian *et al.*, 2016)

The recovery was defined as the ratio between the metabolite quantity released in the pellet or the supernatant and the initial quantity in the crude biomass. The initial composition in the biomass was obtained as following:

- for the starch: quantity recovered in the pellet after two 270 MPa passes in high pressure disrupter (CellD, Constant System) at centrifugation at 3000 g during 5 minutes;
- for the proteins: concentration expressed as BSA_{eq} in the supernatant after two 270 MPa passes in high pressure disrupter and centrifugation at 3000g for 5 minutes;
- for the pigments: methanol extraction on the intact cells after centrifugation.

The product yield (Y) was defined as the ratio between the mass of the product (m_{α}) in the recovery fraction (pellet for starch, supernatant for proteins and pigments) and the total mass of the product α in the initial biomass (M_{α}):

$$Y_{\alpha} = \frac{m_f^{\alpha}}{M_{\alpha}} \quad [105]$$

The purity (P^{α}) was defined as the ratio between the mass of the product α in the recovery fraction (m_f^{α}) and the total mass of the fraction (m_f).

$$P^\alpha = \frac{m_f^\alpha}{m_f} \quad (106)$$

2. Results and discussion

2.1 Biomass composition

C. sorokiniana concentration at the PBR outlet was 1.0 g.l⁻¹. The production was maintained in a steady state with constant irradiation and dilution rate. At the steady state the biomass composition was constant over the time. In particular, the protein content was 35%, the starch content was 7–8%, chlorophyll was 2–3%. The remaining fraction represented 55%. All the percentages were calculated based on 100 g of biomass dry weight.

2.2 Evolution of the size distribution during bead milling

For each experimental condition, the size distribution of the cells in the lysate has been followed during the process time. Figure68 shows the evolution of the size distribution with 0.375 mm glass beads at 10m.s⁻¹ and with 0.2mm zirconia beads at 14m.s⁻¹. The culture of *Chlorella sorokiniana* had cell sizes ranging between 2.5µm and 7.5µm with a mean diameter D_{ESD} of 4.5µm ± 0.2µm and a standard deviation of 0.7µm. Using 0.375mm glass beads at 10m.s⁻¹ (Figure68.a), the size distribution slightly shifted to the left after the first pass. Big cells were disrupted more efficiently than the small ones. However, no similar trend was observed with the 0.2mm zirconia beads at 14m.s⁻¹ (Figure68.b). Cell disruption kinetics was obtained by modeling the cell disruption rate for each size class as a function of time, considering the RTD (Residence Time Distribution) in the process.

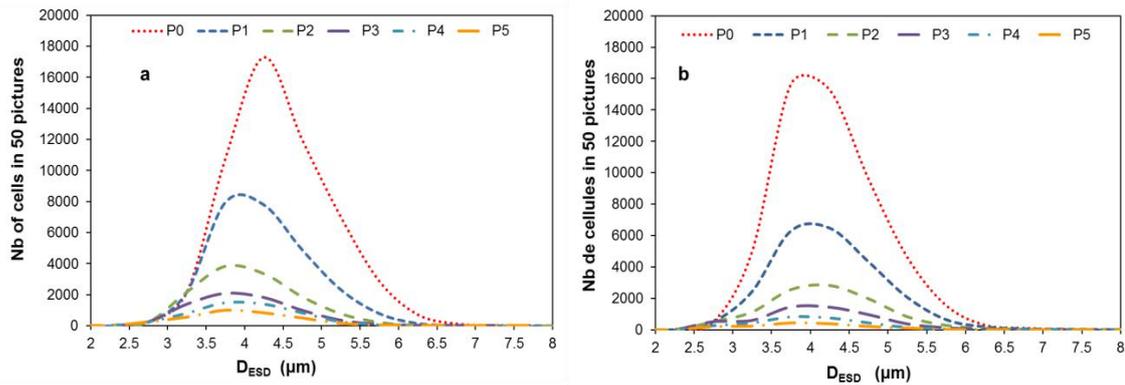


Figure68 : *Chlorella sorokiniana* cells size distribution (number of cells at constant volume in each size class between 2 and 8µm) during bead milling – P0: initial distribution – P1: 1st pass (t=1.3min) – P2: 2nd pass (t=2.6min) – etc. a) 0.375mm glass beads and b) 0.2mm zirconia beads at 10m.s⁻¹.

2.3 Effect of bead size and agitation speed on the overall disruption kinetics

The effect of bead size and agitation speed on disruption kinetics is presented in Figure 69. Due to an important counting uncertainty for extremely small and big cells (size classes with the lowest cell number), the calculation of disruption kinetics constants was restricted to 3 µm–6.5 µm. In Figure 69.a, the disruption kinetics coefficient clearly decreased as the bead size increased. The 0.375mm beads allowed three times higher K values than 1.3mm beads. In Figure 69.b, the impeller tip velocity also improved the disruption kinetics, but only for small beads whereas no significant improvement was observed for bigger beads (over 0.9mm). Using smaller beads at a constant filling ratio results in higher beads number. The efficiency of small beads and high velocities can be explained by the fact that both conditions increase the stress frequency (Kwade and Schwedes, 2007).

2.4 Effect of cell size on the disruption kinetics

The higher resistance of small microalgae cells to bead milling disruption was previously reported by (Montalescot *et al.*, 2015) about two strains of spherical shape: *N. oculata* (3 µm mean diameter) and *P. cruentum* (4µm-9µm). Three times more mechanical energy was necessary for *N. oculata* to reach the same disruption level than *P. cruentum*. However, since the cell membrane and cell wall composition were different for the two strains, the robustness of *N. oculata* couldn't be attributed only to cell size.

Figure 69c and d, show that the disruption kinetics (using glass beads) increased with cell size regardless of the impeller tip velocity or the bead diameter. Big cells of *C. sorokiniana* appeared to be more sensitive to the mechanical bead milling treatment.

The difference between big and small cells was accentuated by increasing the circumferential velocity of the impellers (Figure 69.c). The difference was enhanced when

0.375mm glass beads and 14 m.s⁻¹ velocity are used. In these conditions, the kinetics constants value for 6.25 μm cells was 4 time higher (1.37min⁻¹) than for 3.25μm cells (0.35min⁻¹). For example, in these conditions, for a 1min of treatment, 75% of 6μm cells were disrupted while, 70% of 3μm cells remained intact. Such a behavior revealed the possibility to target bigger cells to recover metabolites that are preferentially accumulated in big cells. For *Chlorella sorokiniana*, the optimal conditions for efficient disruption were ~0.4mm glass beads at 14m.s⁻¹ impeller tip velocity. As previously mentioned, the optimal conditions are strain dependent because of the different cell wall rigidity and composition, and the mean cell size. Optimization studies should be carried out for each adopted strain. Besides, this study aimed to provide a modeling tool for the selection of the bead milling parameters as function of a target cell size, responsible of specific product accumulation.

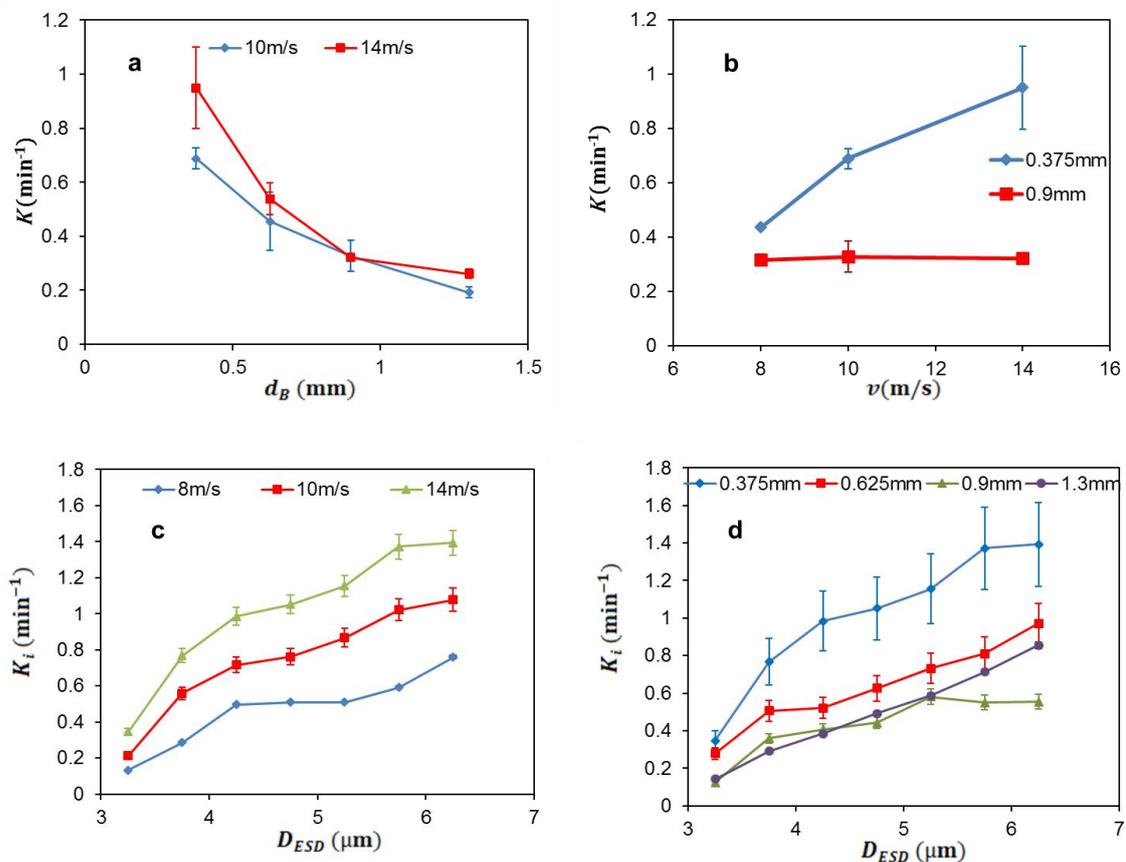


Figure 69 :Bead milling parameters effects on disruption kinetics – a) beads size effect on the overall kinetic constant K – b) Impeller tip velocity effect on the overall kinetic constant K – c) Disruption kinetic constants K_i according to the cell size for 8, 10 and 14 m.s⁻¹ (0.375mm glass beads) – d) Disruption kinetic constants K_i according to the cell size for 0.375, 0.625, 0.900 and 1.30mm glass beads (14 m.s⁻¹).

2.5 Stress model applied to each size class

2.5.1 Model validation

As mentioned in Section 1.2.2 two expressions for SN are proposed and compared. SN_1 (0.9) and SN_2 (0.9), defined in Eqs. (99) and (100), were calculated at t (0.9). t (0.9) is the

treatment time necessary to reach 90% of disruption (103). In Figure 70.a, SN_1 (0.9) values for the small cells were slightly higher than those of the big cells in the 10^{-5} – 10^{-3} J SI range. In Figure 70.b, the SN_2 (0.9) values are not correlated to the cell size as expected from the results of Section 2.4. SN_2 definition does not reflect the longer time needed by small cells, for a given value of SI (corresponding to a set of experimental conditions). Therefore, the definition SN_1 was selected for further analysis of the disruption behavior according to the cell size distribution.

In Figure 70.a, all the SN_1 (0.9) values calculated were around 10^2 , except for the smaller cells (3.25 μm). Montalescot *et al.*(2015) found two zones in the SI/SN diagram: (i) for SI below the critical value, the SN (0.9) decreases when SI increases and (ii) after the critical value no further decrease was observed and SN (0.9) is quite constant. Considering the different size classes, for the small cells (3.25 μm) the SN value is the highest and it decreased with the SI , until a critical SI value around 2.10^{-5} J. For bigger cells, no critical value of SN_1 (0.9) was observed: all applied stress intensities were already higher than the critical one. In fact, (Schweddes and Bunge, 1992) already experienced higher stress intensities than the critical SI of yeast cells, when big glass beads were used.

In Figure 70.c, considering the whole population, no significant effect of the SI on $SN(90)$ was observed. The stress intensities tested were higher than the mean critical intensity required for *C. sorokiniana* cell disruption. In such conditions, the increase of the stress intensity does not reduce the required number of stress events to reach a given disruption rate, but it increases the energy consumption. For an optimal energy use, the bead milling should be operated around the critical SI value. In this study, the critical value was not properly detected, probably because it was lower than 2.10^{-5} J (the lowest SI here considered, Figure 72).

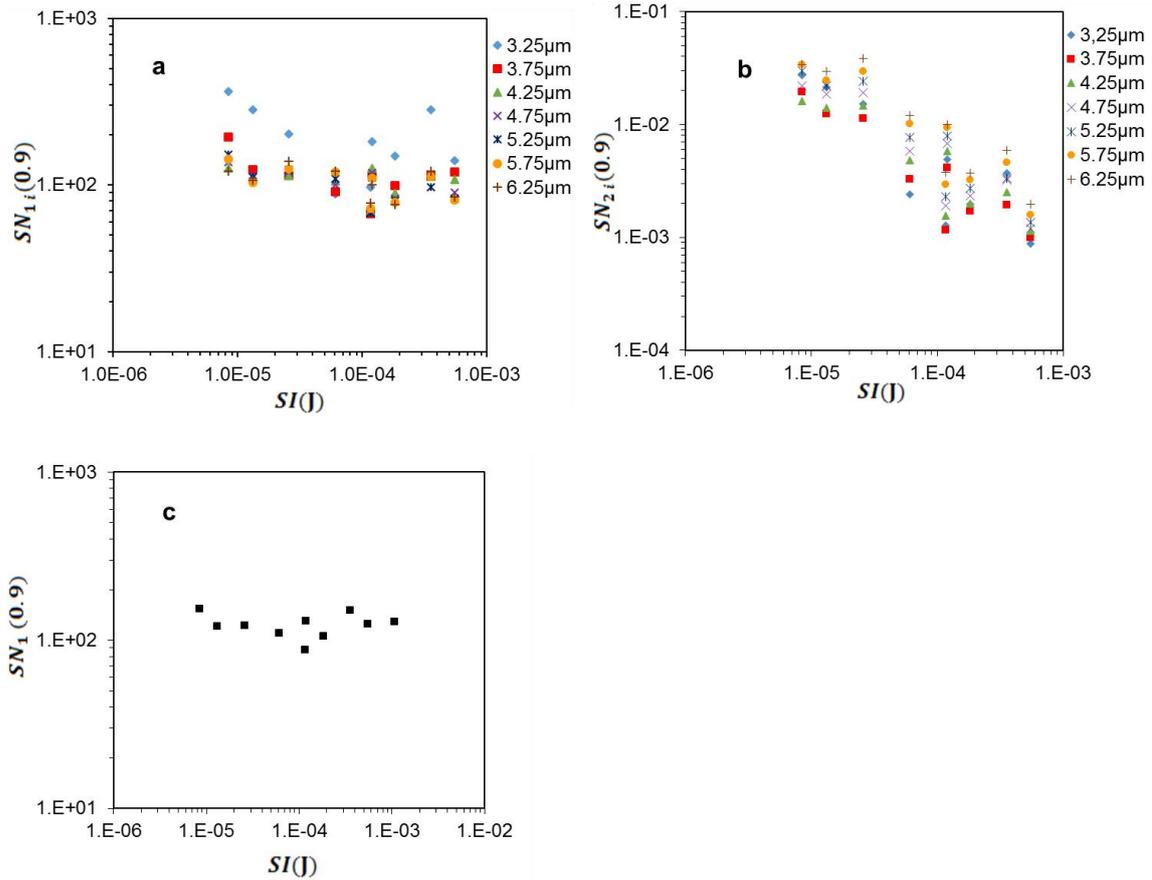


Figure 70 :Comparison of $SN_1(0.9)$ and $SN_2(0.9)$ for 90 % disruption rate prediction according to the stress intensity SI (J) and the microalgal cell size – **a**) $SN_{1_i}(0.9)$ and **b**) $SN_{2_i}(0.9)$ – **c**) $SN_1(0.9)$ applied to the whole population as a function of SI value

2.5.2 Prediction of the disruption kinetics

The analysis of the disruption kinetics results of the different size classes highlighted a correlation to the stress frequency, SF . In Figure 71, the disruption kinetic constants for the various cell sizes (K_i) and for the overall population (K) are presented as function of SF_1 . Except for 3.25 μm cells that had a slower disruption, all the other size classes followed the same trend of K_i proportional to the SF_1 value. The mean disruption kinetic constant K can be successfully predicted from SF_1 values. For *Chlorella sorokiniana*, it is a linear function of the stress frequency with $K=0.035 \cdot SF$ (K in min^{-1} and SF in min^{-1}).

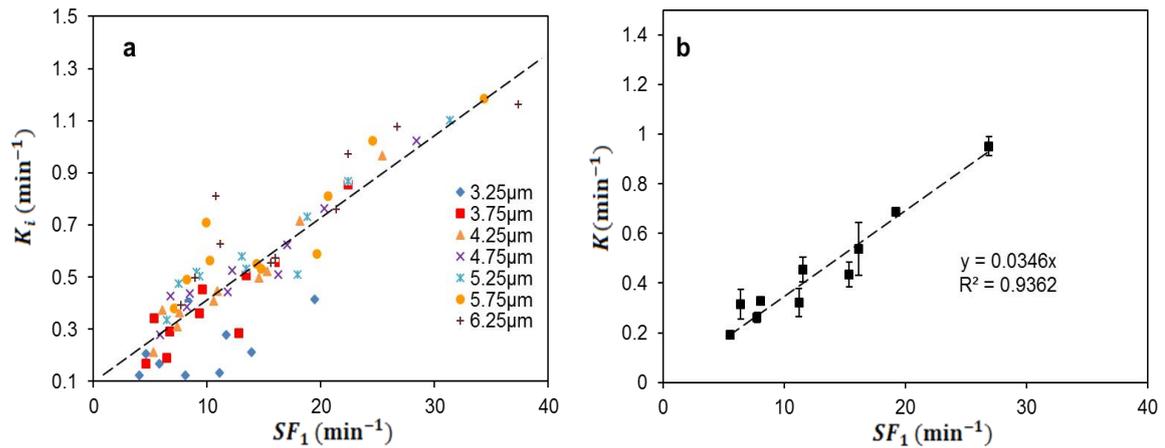


Figure 71 :Correlation between the disruption kinetic constants and the stress frequency SF_1 (s⁻¹) – a) K_i for each size classes – b) K for the overall population.

2.5.3 Prediction of metabolites recovery as function of the energy consumption

The amount of metabolites recovered for different bead milling conditions was quantified. The recovery was referred to the selected centrifuge parameters calculated in the Section 1.3.

In Figure 72, the partitioning of dry matter, starch, protein and chlorophyll between pellet and supernatant is shown as a function of the SI value. In all conditions, 90% of cell disruption was reached. In Figure 72.a, the recovery of the dry matter in pellet and supernatant is shown; in Figure 72.b, c and d, the yield and the purity of starch recovery in the pellet, proteins and chlorophyll recovery in the supernatant are presented. A clear behaviour appeared for all the products:

- Below a SI range (1.10^{-5} – 5.10^{-4} J), corresponding to the grey zone in Figure 72, most of the dry matter (around 70%) still resides in the supernatant after the mild centrifugation. It resulted in high protein recovery in the supernatant (up to 90%), but at the same time high amount of chlorophyll was released (about 75%). In the pellet, 75% of the total starch was recovered in this zone.
- For higher SI values, most of the initial mass (60%) was recovered in the pellet. It produced higher starch recovery in the pellet than for low SI values, to the detriment of the starch purity. The protein yield in the supernatant decreased to the 50%, with a slight purity increase. The chlorophyll release in the supernatant decreased from 60% to 20%.

These results suggest the possibility to select the SI of the bead milling process as function of the main target product and the required purity. For example, if the target product is starch, the highlighted SI range should be selected for high starch recovery (80%) in the pellet

and purity up to 20%. In this zone dry matter, proteins and pigments are mainly released in the supernatant (80% and 70% respectively) and are available for other biorefinery applications.

Otherwise, if the target metabolites are the soluble proteins with low level of chlorophyll associated, SI values higher than 10^{-4} J should be considered. In these conditions the recovery decreased to 50% but the supernatant was enriched up to 70–80% of proteins.

The use of small beads, corresponding to low SI values, resulted in an important miniaturization of the cell fragments and most of them remained in the supernatant after the centrifugation step.

The opposite trend was related to high SI values: the stress frequencies reduced the miniaturization of fragments, resulting in 60% recovery in the pellet during centrifugation. More starch was obviously recovered in the pellet, but together with all the insoluble components of the microalgae. The protein content recovered in the supernatant for high SI is reduced (50%). Safi *et al.* (2017) concluded that the maximum amount of protein released by bead milling represents 50% of the initial protein content of the biomass. We can suggest here that mainly cytoplasmic, water-soluble proteins were released for high SI , even if the 90% of cell disruption was reached. On the contrary, in low SI range, higher comminution was achieved, and part of the non-soluble proteins was released and remained in the suspension after centrifugation.

As a conclusion, the optimization of the bead milling parameters cannot exclude the analysis of the product recovery in the following operation unit (in this case the centrifugation). The data reported highlighted that low SI did not correspond to mild disruption, while mild disruption could be considered for SI higher than the transition zone (in grey). In fact, high SI avoided miniaturization of the cell fragments but increased the energy consumption. Nevertheless, high energy consumption in the disruption step, could be justified if it simplifies and save energy in the following steps for biomolecules separation (Safi *et al.*, 2017; Montalescot PhD thesis).

The understanding of the different repartition of the product in function of the energy requirement for the disruption is a crucial point for the design of downstream process in function of the target product and the refinery application. It opens the way to a customization of the disruption parameters in function of the value and the required purity of the target product.

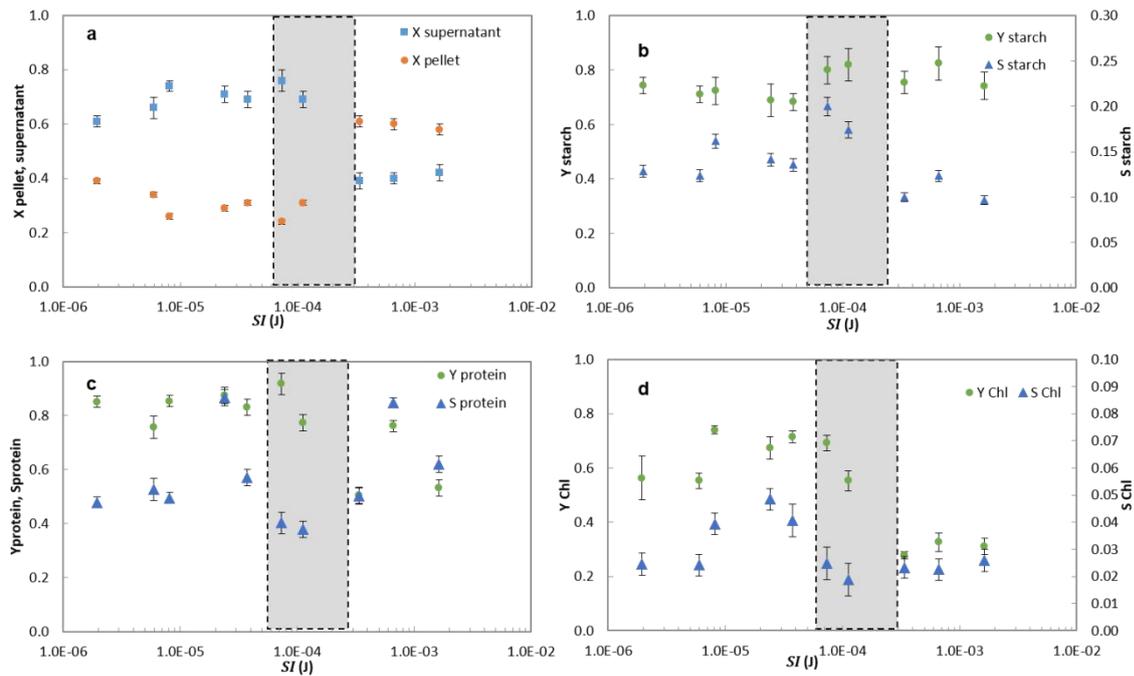


Figure 72 :Supernatant and pellet distribution of different products according to the SI value–**a**) dry matter recovery–**b**) starch yield and purity in the pellet–**c**) protein yield and purity in the supernatant – **d**) chlorophyll yield and purity in the supernatant – dashed lines correspond to initial biomass composition.

CONCLUSION

A kinetic model, including cell size distribution, was developed for *Chlorella sorokiniana* disruption in continuous bead miller. Glass beads of **0.4 mm** size at impeller velocity of **14 m.s⁻¹** were the **optimum conditions** for efficient cell disruption. These conditions allowed disruption of big cells faster than small ones. A modified **Stress Number, including cell diameter**, was then proposed and validated.

Separation of starch, proteins and chlorophyll by mild centrifugation was studied according to disruption parameters. **Optimal disruption** conditions led to **extreme comminution**. An intermediate zone was pointed out for allowing **moderate energy consumption** and preserving **efficient metabolites separation by centrifugation**.

Chapitre 6 : Industrialisation du broyage à billes de microalgues

Résumé :

Ce chapitre examine différents aspects du développement industriel du broyage à billes de microalgues. Une première partie est consacrée à la transposition des résultats de laboratoire à l'échelle pilote. La seconde partie concerne l'optimisation du procédé en termes de : consommation spécifique d'énergie, capacité de production et mode opératoire.

Introduction	156
1. Changement d'échelle	157
1.1 Méthode d'extrapolation.....	157
1.2 Etude de la DTS.....	158
1.3 Validation du modèle cinétique	160
2. Optimisation de la consommation énergétique et de la productivité	161
2.1 Effet de la concentration sur l'efficacité du broyage.....	161
2.2 Consommation spécifique d'énergie.....	163
2.3 Capacité de production.....	165
3. Choix du mode opératoire	165
Conclusion	167

INTRODUCTION

Dans le cadre de la valorisation des microalgues sous forme d'extraits, il est utile d'évaluer la mise en œuvre de toutes les étapes du bioraffinage à échelle industrielle y compris le broyage à billes. A notre connaissance, la transposition des résultats de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote n'a pas été abordée concernant cette dernière technologie pour le cas des microalgues. Des études à différentes échelles et géométries ont été menées (Doucha and Lívanský, 2008) pour le broyage de *C. vulgaris* mais aucune méthode d'extrapolation n'a été proposée. Le modèle de stress, et particulièrement le modèle de stress amélioré a cependant déjà été utilisé pour la transposition des résultats de broyage de matériaux cristallins à différentes échelles et géométries de broyeurs (Kwade and Schwedes, 2007; Breitung-Faes and Kwade, 2014; Breitung-Faes, 2017). De façon analogue, cette approche sera ici appliquée aux microalgues.

Une autre problématique de la production massive des microalgues est la forte consommation énergétique du bioraffinage. Dans ce contexte, le broyage à billes est une méthode peu efficace énergétiquement : il semble que seulement 1 % de l'énergie fournie soit utilisée pour le broyage selon Postma *et al.* (2017). Une optimisation des conditions opératoires afin de minimiser la consommation énergétique est donc nécessaire. La capacité de production et le mode opératoire sont également importants pour l'évaluation technico-économiques des procédés.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la validation d'une méthode d'extrapolation du broyage à billes de *N. oceanica*. Ensuite, l'optimisation de la consommation spécifique (par kg de biomasse traitée) d'énergie, et de la productivité (en broyat de microalgues) ainsi que le choix du mode opératoire sont discutés.

1. Changement d'échelle

Dans cette partie deux expériences à échelle laboratoire (600 ml) avec des billes de 0,5 mm, un débit de 150 ml.min⁻¹ et les vitesses d'agitation de 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹ ont été transposées à l'échelle pilote (10 l) afin de valider la prédiction de la cinétique à partir du modèle de stress. La microalgue utilisée est une biomasse décongelée de *N. oceanica*. La microalgue a un diamètre moyen de 2,6 µm, la plus petite taille de billes disponible (0,5 mm) pour le broyeur à l'échelle pilote a donc été utilisée. Le broyeur à billes pilote est un broyeur NETZSCH LMZ 10 disponible sur la plateforme Algosolis. Son système d'agitation est constitué de 4×9 doigts et d'un arbre d'agitation. La séparation des billes se fait par centrifugation dans les fentes de l'arbre avec des tamis (Figure 73).

1.1 Méthode d'extrapolation

Les paramètres suivants ont été conservés dans le changement d'échelle :

- Le taux de remplissage des billes $\varphi = 80 \%$
- La vitesse périphérique de l'agitateur v et le diamètre des billes $d_B=0,5$ mm permettant de conserver la fréquence de stress :

$$SF \propto n \cdot \zeta \cdot \frac{d_\mu}{d_B} \propto v \cdot \zeta \cdot \frac{d_\mu}{d_B} \quad (107)$$

- Le temps de séjour moyen dans le broyeur.

On considère que le temps de séjour moyen correspond au temps de passage τ (min). Le débit équivalent Q (l.min⁻¹) à grande échelle est donc calculé selon la relation suivante :

$$Q = \frac{((1 - \varphi) + \varepsilon \cdot \varphi) \cdot V}{\tau} \quad (108)$$

V : le volume du broyeur pilote.

Le produit $SF \times \tau$ donne une valeur caractéristique du nombre de stress SN subis par les cellules dans le broyeur qui est conservée dans le changement d'échelle.

- L'énergie de stress SE .

Ne disposant pas des distributions d'énergie de stress des deux broyeurs, on ne peut calculer le \overline{SE} tel qu'il est défini dans le modèle de stress amélioré (Section 3.2.3. du chapitre 1). Le SE (équation(109)) est calculé à partir de l'énergie cinétique maximale des billes. La vitesse périphérique de l'agitateur v (m.s⁻¹) est définie dans le broyeur pilote par la consigne de fréquence d'agitation n (rpm) calculée par (110).

$$SE = \rho \cdot d_B^3 \cdot v^2 \quad (109)$$

$$n = 60 \cdot \frac{v}{2\pi \cdot R_a} \quad (110)$$

R_a (m) étant le rayon du rotor du système d'agitation (Figure 73. 2).

Ainsi les deux paramètres SE et SN du modèle de Stress sont conservés dans le changement d'échelle

1.2 Etude de la DTS

La DTS de l'unité pilote est acquise par conductimétrie selon la méthode décrite dans la section 4.2 du chapitre 2. La quantité de sel introduite a été augmentée proportionnellement au volume de suspension disponible dans le broyeur pilote. Le signal est traité de manière similaire. La mesure est faite pour les deux vitesses d'agitation : 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹. Le débit équivalent au temps de passage du broyeur laboratoire (1,9 ±0,1 min) est de 2,4 ±0,2 l.min⁻¹ sur le broyeur pilote.

La DTS est modélisée avec les deux modèles : cascade n RPA et n RPA avec recirculation. Pour le broyeur pilote, il ne s'agit plus de disques constituant des compartiments mais de doigts. Il y a 4 doigts (Figure 73.1) par section (perpendiculairement à l'axe de rotation) de la chambre qu'on peut assimiler à un disque et donc 9 sections agitées. Le nombre de RPA est donc fixé à 9 pour le modèle avec recirculation.

Les résultats de la modélisation sont présentés dans la Figure 74.

La valeur de n dans le modèle n-RPA vaut 2 pour les deux vitesses d'agitation mais l'écart entre le modèle reste important. Il en est de même avec le modèle 9-RPA avec recirculation dont les taux de recirculation α valent respectivement 5,4 et 5,5 pour les vitesses 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹. Aucun des deux modèles utilisés ne semble pas refléter l'hydrodynamique du broyeur pilote de manière précise.

Par ailleurs, les courbes expérimentales des DTS du broyeur pilote ont des pics plus bas (à ~0,6) comparativement aux DTS mesurées sur le broyeur de laboratoire (pics entre 0,7 et 0,9). Cela peut être dû à une plus forte dispersion dans le broyeur pilote dont la géométrie (9×4 doigts d'agitation pour un volume agité de 10 l) est différente du broyeur de laboratoire (4 disques d'agitation pour un volume de 600 ml). Les deux DTS expérimentales sont très proches avec des dispersions proches : l'écart-type relatif des distributions vaut respectivement 0,74 et 0,79 à 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹.

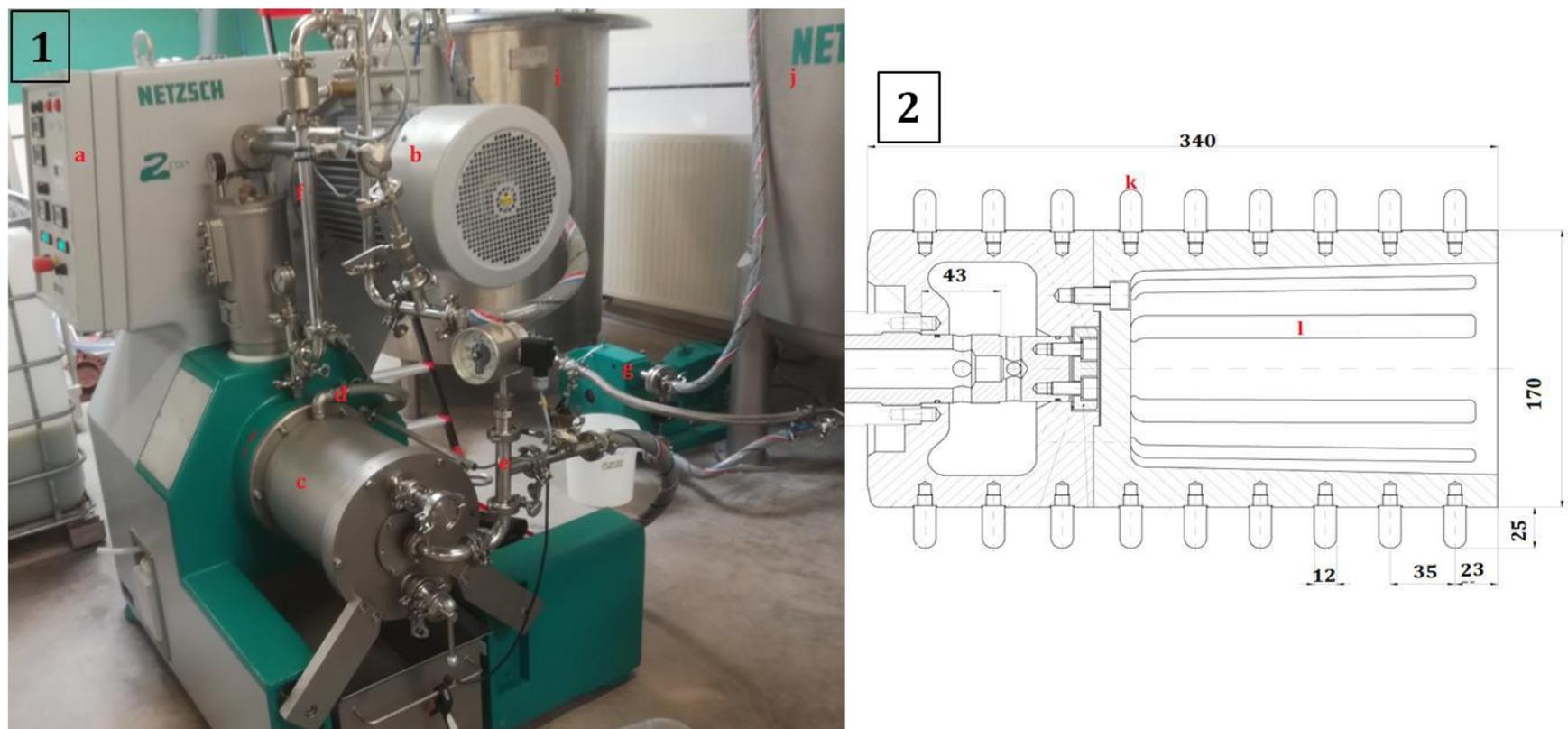


Figure 73 : **1** Photo du montage du broyeur pilote : **a** panneau de contrôle, **b** moteur d'entraînement de l'agitation, **c** chambre de broyage, **d** entrée eau de refroidissement, **e** sortie produit, **f** entrée suspension, **g** pompe d'alimentation, **i** et **j** cuves d'alimentation ; **2** Schéma coté du système d'agitation du broyeur NETZSCH LMZ 10 : **k** doigt d'agitation, **l** fente de récupération des billes

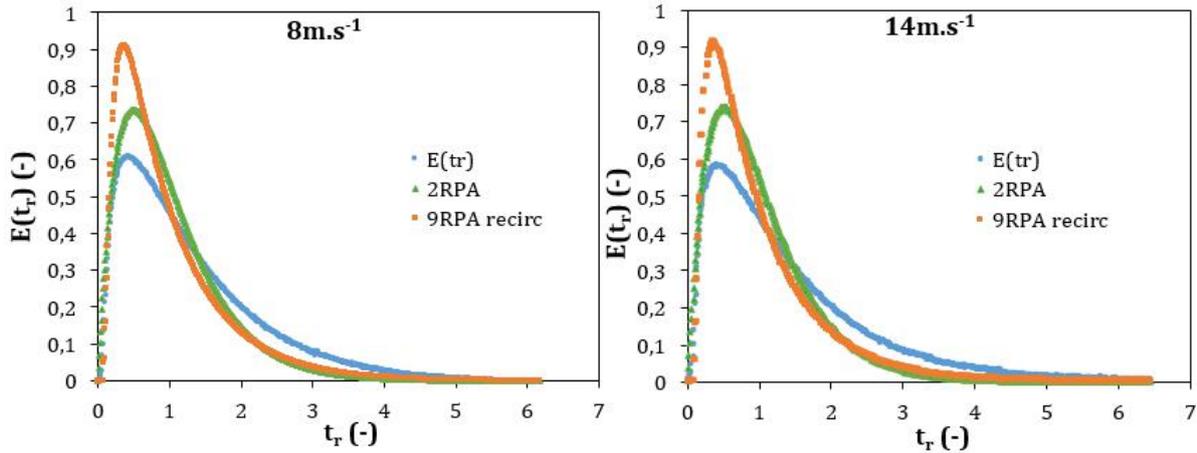


Figure 74 : DTS expérimentale $E(t_r)$ et modèle 2 RPA pour les deux conditions de broyage à 8 m.s^{-1} et 14 m.s^{-1}

1.3 Validation du modèle cinétique

Etant donné que les modèles de DTS ne permettent pas une modélisation fine de l'hydrodynamique dans le broyeur pilote, la DTS expérimentale a directement été utilisée afin de calculer les constantes cinétiques expérimentales K_{exp} selon la méthode décrite dans la section 1.3 du chapitre 4.

Tableau 21 : Comparaison des constantes cinétiques obtenues aux échelles laboratoire et pilote pour le broyage de *N. oceanica* à 8 m.s^{-1} et 14 m.s^{-1} : $\varphi = 80 \%$, $d_B = 0,5 \text{ mm}$; $\tau = 1,8 \text{ min}$

Vitesse	Laboratoire		Pilote		Comparaison	
	$K_{2RPA} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$K_{exp} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$K_{2RPA} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$K_{exp} \text{ (min}^{-1}\text{)}$	ΔK_{exp}	$K_{exp,pilote}$
					$K_{exp,laboratoire}$	$K_{exp,laboratoire}$
8 m.s^{-1}	$0,35 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,03$	$0,32 \pm 0,02$	17%	0,83
14 m.s^{-1}	$0,59 \pm 0,11$	$0,60 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,16$	$0,52 \pm 0,04$	14%	0,86

Les valeurs des constantes cinétiques de destruction expérimentales K_{exp} obtenues à l'échelle pilote sont légèrement inférieures aux valeurs obtenues à l'échelle laboratoire avec un écart relatif de 14 % et 17 % par rapport à l'échelle laboratoire respectivement à 8 m.s^{-1} et à 14 m.s^{-1} (Tableau 21). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces écarts. La différence de géométrie entre les deux broyeurs, peut causer des écarts entre les \overline{SE}_p et \overline{SF} effectifs dans les broyeurs pilote et laboratoire pour une même valeur de SE . Malgré ces différences, les valeurs des constantes cinétiques obtenues à grande échelle restent très proches des marges d'incertitudes d'estimation et la méthode d'extrapolation est donc satisfaisante.

2. Optimisation de la consommation énergétique et de la productivité

2.1 Effet de la concentration sur l'efficacité du broyage

Une des stratégies pour limiter la consommation spécifique d'énergie pour le broyage est d'augmenter la teneur en matière sèche des suspensions. La biomasse étant limitée, cette étude est faite sur le broyeur de laboratoire. L'effet de la concentration étudiée dans la section 3.4 du chapitre 4 a été étudié cette fois jusqu'à 100 g.l⁻¹ avec une biomasse décongelée de *N. oceanica* disponible en quantité suffisante. Trois concentrations en matière sèche de biomasse de *N. oceanica* ont été traitées : 2 g.l⁻¹, 10 g.l⁻¹ et 100 g.l⁻¹ avec un débit à 150 ml.min⁻¹. Les constantes cinétiques ont été calculées en considérant un modèle de 2-RPA pour la DTS. Pour les cellules de *N. oceanica* l'étude n'a pas été faite par classe de taille car les cellules sont très petites et leur distribution de taille est étroite (D_{eqpc} moyen de 2,6 μm avec un écart-type 0,3 μm). Le comptage a donc été fait manuellement pour 6 photos par échantillon afin de limiter les erreurs liées au comptage de débris cellulaires avec Image J.

A la vitesse de 14 m.s⁻¹, la constante cinétique augmente en fonction de la matière sèche (Figure 75). En revanche, à 8 m.s⁻¹ la cinétique augmente jusqu'à 10 g.l⁻¹ puis chute entre 10 et 100 g.l⁻¹. La pente en échelle logarithmique à 8 m.s⁻¹ entre 2-10 g.l⁻¹ est proche de celle de la courbe à 14 m.s⁻¹. L'augmentation de la concentration en matière sèche permet d'augmenter l'efficacité de broyage, mais dans des plages qui sont dépendantes de la vitesse d'agitation. Plus la vitesse d'agitation est importante plus la limite haute de concentration en MS de cette plage est élevée. Ce comportement a déjà été mis en évidence avec les expériences avec *C. vulgaris* entre 1 et 30 g.l⁻¹ (Section 3.4 du chapitre 4).

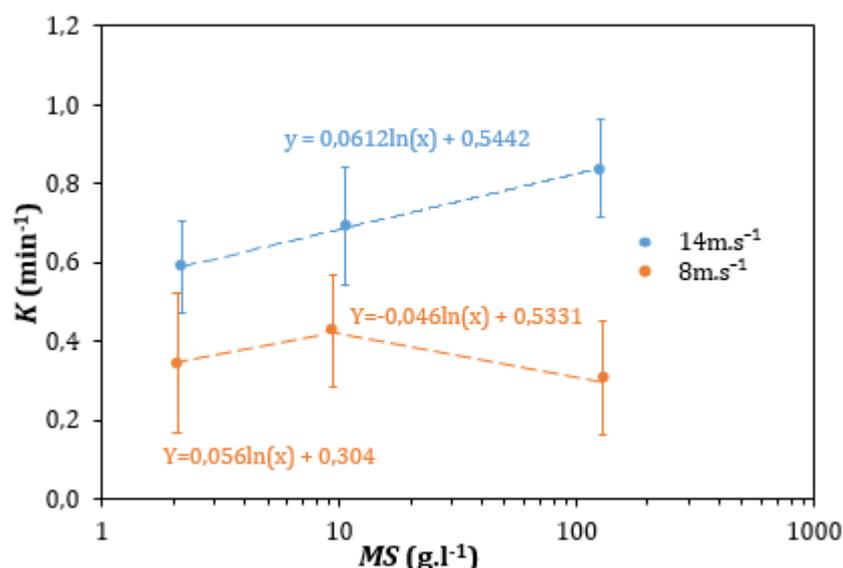


Figure 75 : Effet de la concentration en matière sèche sur la cinétique de destruction

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce comportement :

- Ce phénomène pourrait être attribué à un effet de tassement des billes : à 8 m.s⁻¹, l'augmentation de la viscosité au-delà de 10 g.l⁻¹ favorisant l'entraînement des billes par le du transport axial du fluide par rapport au mouvement centrifuge des billes.
- Le transfert de la quantité de mouvement des billes aux particules serait moins efficace avec l'augmentation de viscosité ou le changement de comportement rhéologique à 8 m.s⁻¹. La fraction de volume actif dans la chambre de broyage serait par conséquent réduite (voir section 3.2.1.1 du chapitre 1).
- En considérant le modèle de stress, pour des conditions fixées, le broyeur transmet aux particules une fréquence de stress moyenne SF . Lorsqu'on augmente la concentration en matière sèche, on augmente la possibilité que plusieurs cellules soient stressées simultanément lors d'un évènement stressant. Ainsi, dans le cas où la suspension est trop diluée (~ 1 g.l⁻¹), il existe des évènements stressants inutiles car peu de cellules sont présentes. Au contraire, lorsqu'on augmente la concentration, à tous les évènements stressants il y a une voire plusieurs cellules stressées simultanément d'où une amélioration de l'efficacité des stress. L'énergie de stress disponible par cellule deviendrait insuffisante pour vaincre sa résistance à partir de 10 g.l⁻¹ à 8 m.s⁻¹. En effet, plusieurs cellules pourraient être broyées simultanément divisant ainsi l'énergie moyenne reçue par cellule. Dans cette logique, la limite théorique de la concentration en MS à partir de laquelle l'énergie de stress reçue par cellule devient insuffisante devrait être plus élevée que 100 g.l⁻¹ à 14 m.s⁻¹. Afin de vérifier la cohérence de cette dernière hypothèse avec les résultats expérimentaux, le nombre de stress par cellule requis pour avoir 90 % de destruction $SN_c(0,9)$ a été calculé à partir de la fréquence de stress SF (min⁻¹) selon l'équation suivante :

$$SN_c(0,9) \propto \frac{SF \cdot t(0,9)}{N_c} \quad (111)$$

N_c (cell.ml⁻¹) désigne le nombre de cellules par ml dans la suspension d'alimentation

$t(0,9)$ (min) est calculé à partir des constantes cinétiques de destruction

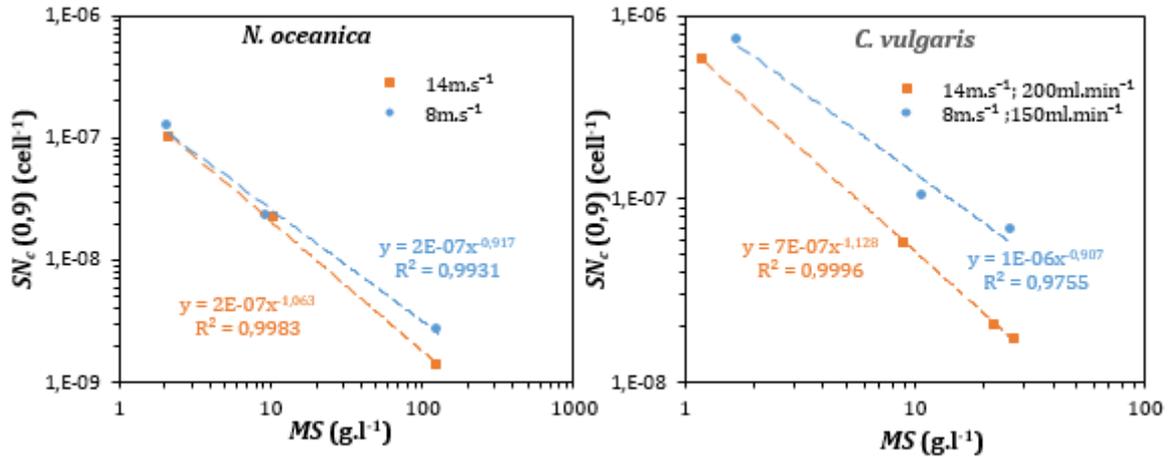


Figure 76 : Effet de la matière sèche sur le nombre de stress requis par cellule pour obtenir 90 % de destruction $SN_c(0,9)$ pour *N. oceanica* (billes verre 0,5 mm ; $Q=150 \text{ ml}\cdot\text{mn}^{-1}$) et *C. vulgaris*

Les résultats montrent que le nombre de stress requis par particule diminue avec la matière sèche pour différentes conditions de broyage et pour les deux microalgues *C. vulgaris* et *N. oceanica*. Les courbes de régression ont des pentes proches de -1. Cela implique que l'efficacité des stress augmente proportionnellement avec la matière sèche (ou la concentration cellulaire).

En résumé, il ressort que l'efficacité des chocs est améliorée en augmentant la concentration en matière sèche de 1 à 10 g.l⁻¹. Au-delà de 10 g.l⁻¹, l'augmentation de la concentration en MS doit être compensée par une augmentation de la vitesse d'agitation pour maintenir l'efficacité du broyage.

2.2 Consommation spécifique d'énergie

Les résultats expérimentaux obtenus à l'échelle laboratoire ont été utilisés pour simuler les résultats à grande échelle. En effet, sur le broyeur de laboratoire les variations de consommation d'énergie en fonction des conditions opératoires n'étaient pas détectables. Comme pour le broyeur de laboratoire, on considère que l'efficacité du broyage à 100 g.l⁻¹ est au moins équivalente à celle à 1 g.l⁻¹ à 14 m.s⁻¹ ($K=0,8 \text{ min}^{-1}$) et légèrement réduite à 8 m.s⁻¹ ($K = 0,3 \text{ min}^{-1}$). Ces valeurs de constantes cinétiques sont corrigées avec un facteur de 0,83 pour prendre en compte la perte d'efficacité au passage à grande échelle (voir dernière colonne Tableau 21). La puissance instantanée du broyeur pilote vaut 2,9 kW et 8,6 kW respectivement à 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹. On suppose que ces puissances instantanées ne varient pas de façon significative avec l'augmentation de matière sèche entre 1-100 g.l⁻¹. L'énergie spécifique, c'est-à-dire l'énergie consommée par unité de biomasse traitée, pour obtenir un taux de destruction donné $E_s(\eta)$ est calculée selon la relation suivante :

$$E_s(\eta) = \frac{P \cdot t(\eta)}{MS \cdot V_{vide}} \quad (112)$$

$t(\eta)$: le temps de séjour nécessaire pour obtenir un taux de destruction η calculé à partir des constantes cinétiques K .

V_{vide} : le volume de vide dans le broyeur qui vaut 4,72 l.

MS : la matière sèche de la suspension : 100 g.l⁻¹

Tableau 22 : Valeurs de la consommation spécifique d'énergie calculées en fonction du taux de destruction à 100 g.l⁻¹ de *N. oceanica* pour les vitesses d'agitation 8 m.s⁻¹ et 14 m.s⁻¹.

η	$E_s(\text{kWh.kg}_{MS}^{-1})$		
	70 %	80 %	90 %
8 m.s ⁻¹	0,60	0,90	1,57
14 m.s ⁻¹	0,75	1,13	1,98

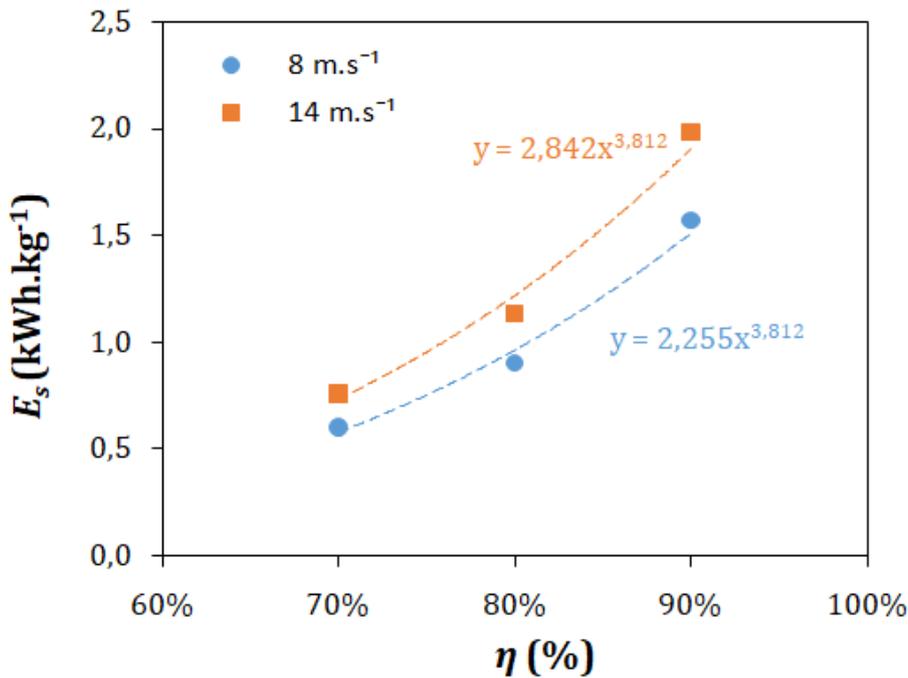


Figure 77 : Consommation spécifique d'énergie en fonction du taux de destruction de *N. oceanica* pour une MS de 100 g.l⁻¹

La consommation spécifique pour un même taux de destruction est presque deux fois plus faible à 8 m.s⁻¹ qu'à 14 m.s⁻¹. Un minimum de **0,60 kWh.kg_{MS}⁻¹** est atteint pour un taux de destruction de 70 % avec un temps de traitement de 6,4 min.

Pour améliorer le taux de destruction de 70 % à 90 % la consommation spécifique est presque triplée (de 0,60-1,57 kWh.kg_{MS}⁻¹). Les valeurs d'énergie spécifiques sont cohérentes avec les résultats de Postma *et al.*, (2017) qui ont obtenu des consommations spécifiques de 0,47

kWh.kg_{MS}⁻¹, 1,42 kWh.kg_{MS}⁻¹, et 1,78 kWh.kg_{MS}⁻¹ respectivement pour *T. suecica*, *C. vulgaris* et *N. oleoabundans* avec des billes de zirconium de 0,3 mm. Pour une valeur énergétique de la biomasse de microalgue estimée à 6,82 kWh.kg_{MS}⁻¹, le Département National d’Energie (DOE) des Etats Unis estime qu’il faut consommer moins de 10 % de cette valeur pour l’étape d’extraction/broyage (U.S. DOE 2010., 2010). La valeur trouvée ici respecte cet objectif et pourrait être potentiellement être améliorée soit avec des billes plus petites et denses et/ou avec un broyage à plus petite vitesse. A noter que la consommation spécifique dans le broyeur à bille reste à 4 ordres de grandeurs supérieure à la l’énergie de rupture des cellules de microalgues : de 6,88.10⁻³ kWh.kg_{MS}⁻¹ à 2,52.10⁻⁴ kWh.kg_{MS}⁻¹ pour *C. vulgaris* (Günther *et al.*, 2016) et 1,87.10⁻⁴ kWh.kg_{MS}⁻¹ pour *T. suecica* (A. K. Lee *et al.*, 2013).

2.3 Capacité de production

La capacité de production d’une biomasse $P(\eta)$ en fonction du taux de destruction voulu est calculée selon la relation suivante :

$$P(\eta) = \frac{MS \cdot V_{vide}}{t(\eta)} \quad (113)$$

η	P (kg _{MS} .h ⁻¹)		
	70 %	80 %	90 %
8 m.s ⁻¹	4,8	3,2	1,8
14 m.s ⁻¹	11,4	7,6	4,4

Tableau 23 : Capacité de production du broyeur pilote avec une suspension de 100 g.l⁻¹ de *N. oceanica*

La capacité de production est deux fois plus importante à 14 m.s⁻¹ qu’à 8 m.s⁻¹ étant donné les cinétiques plus rapides. Il faudra donc en fonction des cas d’application faire un compromis entre la consommation spécifique d’énergie, le taux de destruction et la capacité de production.

3. Choix du mode opératoire

Le broyage à 8 m.s⁻¹ étant d’un point de vue énergétique plus favorable, l’effet du mode opératoire sur l’efficacité du broyage a été étudié dans cette condition. Un volume de 200 l de biomasse à 1 g.l⁻¹ a été traité selon deux modes dans le broyeur pilote.

- Le mode pendule qui consiste à faire passer l’intégralité de la suspension par le broyeur avec plusieurs passages. Deux cuves d’alimentation sont alors utilisées alternativement.
- Le mode de recirculation pour lequel la sortie du broyeur est reconnectée directement à la cuve d’alimentation. L’échantillonnage est fait dans la cuve à des intervalles d’une heure.

Conclusion générale

Toutes les cuves sont agitées pour en assurer l'homogénéité et le débit de fonctionnement est fixé à $146 \pm 10 \text{ l.h}^{-1}$.

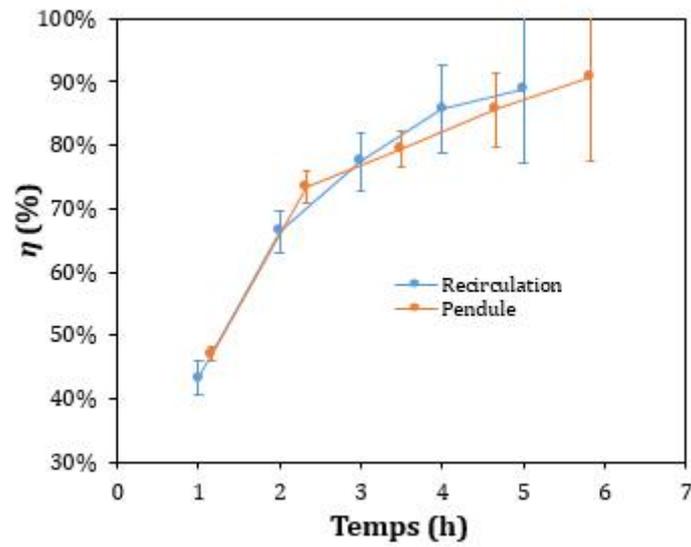


Figure 78 : Comparaison des cinétiques de destruction selon le mode opératoire de broyage

Les résultats (Figure 78) obtenus montrent qu'il n'y a pas d'impact significatif du mode de fonctionnement sur le temps requis pour produire un broyat à un niveau de destruction donné. Le mode de recirculation qui demande moins d'équipements (une seule cuve agitée) est donc préférable pour une production à grande échelle.

CONCLUSION

Le modèle de stress a permis de transposer les résultats de broyage d'une échelle laboratoire (**600 ml**) à l'échelle pilote (**10 l**) en conservant l'énergie de stress **SE** et le nombre de stress **SN**. Les différences de cinétiques entre échelle pilote et laboratoire sont faibles (environs 17 %) malgré la différence de géométrie d'agitateur, et l'utilisation d'un modèle de stress sous sa forme simplifiée (valeur maximale de **SE** au lieu de la valeur moyenne).

L'extrapolation des résultats obtenus avec une biomasse de **100 g.l⁻¹** avec le broyeur pilote a permis d'estimer une consommation minimale de **0,60 kWh.kg_{MS}⁻¹** pour obtenir un taux de destruction de **70 %** avec *N. oceanica* obtenu en **6 min** de traitement à **8 m.s⁻¹**. L'augmentation de la vitesse à **14 m.s⁻¹** permet d'augmenter la capacité de production à **11,4 kg_{MS}.h⁻¹** pour un taux de destruction de 70 %, au détriment de la consommation énergétique. La comparaison des modes opératoires en pendule et en recirculation a montré peu d'influence sur l'efficacité de destruction

Conclusion générale

1. Conclusions de l'étude

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du développement de procédés de bioraffinage des microalgues en voie humide. Elle est focalisée sur le broyage à billes technologie d'intérêt pour la destruction cellulaire. Son fonctionnement doit être contrôlé du fait de son impact sur les coûts et la complexité des procédés de fractionnement et de purification à mettre en œuvre ensuite.

La particularité de l'étude est qu'elle inclut l'effet de la taille des cellules des microalgues dans la détermination des cinétiques de destruction. Le but était de prédire les cinétiques de destruction par classe de taille et de permettre l'extrapolation des résultats expérimentaux de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote. Pour cela, l'hydrodynamique dans le broyeur a été couplée avec un modèle cinétique de premier ordre pour déduire expérimentalement les constantes cinétiques de destruction cellulaire. Le modèle semi-empirique de stress a alors été développé pour corrélérer les cinétiques de destruction aux paramètres opératoires du broyeur. La libération de molécules d'intérêts et le couplage du broyage avec une centrifugation douce pour la récupération de biomolécules ont également été étudiés et modélisés.

L'étude bibliographique détaille les différents procédés de bioraffinage. Elle inclut les différentes méthodes de production et de récolte des microalgues. La transformation de la biomasse en bioénergies et la valorisation des différentes fractions sont alors présentées. Un accent a été mis sur les méthodes de destruction cellulaires qui sont déterminantes dans les coûts du downstream processing. Le broyage à billes apparaît comme une méthode efficace, permettant de préserver les composés d'intérêts et de moduler leur libération afin d'en faciliter la séparation. La revue des études sur le broyage à billes de microalgues a mis en exergue un besoin de développer des méthodes de modélisation de l'opération. Une synthèse bibliographique a donc été ajoutée sur les approches de modélisation du broyage à billes, principalement issue de l'industrie des minerais.

La première partie expérimentale de la thèse a été consacrée à l'effet des hétérogénéités (état dans le cycle cellulaire et taille) dans les cultures de microalgues sur la fragilité des cellules au broyage mécanique. Dans cette partie, la synchronisation d'une culture de *N. oleoabundans* a permis d'isoler deux états extrêmes du cycle cellulaire : les cellules mères et les cellules filles. Le broyage à billes d'une culture dans ces états opposés a montré que les cellules mères ont des cinétiques trois fois plus rapides que les cellules filles. Or, les cellules mères sont les plus grosses et contiennent plus de molécules de réserves. Par une analogie avec les cycles solaires naturels l'avantage d'effectuer une récolte cultures solaires en fin de journée a été mis en évidence : les

cellules sont plus riches en réserves et potentiellement plus fragiles au broyage à billes. L'effet unique de la taille a ensuite été étudié sur des cultures non synchronisées de *C. sorokiniana* et de *P. kessleri* avec une autre méthode de destruction mécanique : le broyage haute pression. Cette méthode a confirmé la grande fragilité des grosses cellules comparativement aux petites déjà observée dans les deux états de la culture de *N. oleoabondans*. Le broyage haute pression, qui est une méthode simple et rapide, peut donc être utilisé pour une pré-caractérisation de la fragilité des cellules au broyage mécanique.

Dans la partie modélisation de la cinétique de broyage à billes, l'hydrodynamique dans le broyeur, les effets des différents paramètres principaux du broyeur (taille des billes, vitesse d'agitation, débit d'alimentation et concentration des suspensions), et l'utilisation d'un modèle de stress reformulé incluant la taille des cellules ont été détaillés. Deux modèles de DTS ont été comparés : le modèle cascade de n-RPA avec n déterminé par ajustement avec la DTS expérimentale et le modèle n-RPA avec recirculation où n est donné par le nombre de disques d'agitation et le taux de recirculation α déterminé par ajustement. Le modèle avec recirculation s'est ajusté plus finement aux DTS expérimentales. Avec le modèle n-RPA, le nombre n valait 2 dans les plages de conditions expérimentales testées. Finalement, l'utilisation du modèle avec recirculation n'a pas apporté plus de précision sur l'estimation des constantes cinétiques de destruction, et le modèle 2-RPA a donc été systématiquement utilisé pour la détermination des constantes cinétiques expérimentales car plus facile à utiliser en pratique.

L'étude paramétrique du broyage à billes des microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri* a permis de mettre en évidence les principaux résultats suivants :

- Pour les microalgues étudiées, les plus petites billes étaient les plus efficaces pour une cinétique rapide. La taille optimale de billes couplant à la fois cinétique rapide et destruction granulo-sélective dépendait de l'espèce. La multiplication de la taille des cellules par un facteur 100 permettait de s'approcher de la taille optimale pour les microalgues *P. kessleri* ($\sim 0,6 \mu\text{m}$) et *C. vulgaris* ($\sim 4 \mu\text{m}$).
- L'augmentation de la vitesse d'agitation a permis d'augmenter les cinétiques de broyage.
- Le débit d'alimentation a eu peu d'effet sur la cinétique de destruction de *C. vulgaris* avec des billes de 0,4 mm. Cependant, les débits très faibles ou très élevés ont affecté l'hydrodynamique dans le broyeur : à faible débit, la DTS était plus dispersée et donc l'efficacité du broyage en a été réduite alors qu'à débits forts, il y a eu probablement un tassement des billes. Pour le broyeur d'étude, un intervalle entre 100-150 ml.min⁻¹ est recommandé.
- L'augmentation de la matière sèche des suspensions jusqu'à 30 g.l⁻¹ n'a pas eu d'impact sur les performances de broyage sauf à faible vitesse (8 m.s⁻¹) où une baisse d'efficacité a

été observée au-delà de 10 g.l⁻¹ de *MS* liée potentiellement à un changement de l'hydrodynamique dans le broyeur et/ou de la rhéologie des suspensions

L'adaptation du modèle de stress au broyage des microalgues *C. vulgaris* et *P. kessleri* a confirmé la proportionnalité entre la probabilité qu'un évènement stressant soit efficace avec la surface des billes et le diamètre des cellules. Dans les plages de conditions testées, l'énergie de stress était supérieure à l'optimum théorique requis pour broyer les cellules. Les conditions d'utilisation optimales de l'énergie étaient donc celles fournissant les *SE* les plus faibles (0,375 mm à 8 m.s⁻¹). Une relation de proportionnalité entre constantes cinétiques de destruction et fréquences de stress a donc pu être établie. La comparaison des cinétiques des deux cultures a montré que la culture de *P. kessleri* était globalement plus fragile que celle de *C. vulgaris*. Cependant, à taille équivalente les cellules de *P. kessleri* étaient plus rigides.

En ce qui concerne la libération sélective des protéines de *P. kessleri* vis-à-vis de la chlorophylle a, les conditions optimales étaient les billes de 0,625 mm à 10 m.s⁻¹. Finalement, les conditions de cinétique rapide (billes de 0,375 mm à une vitesse de 14 m.s⁻¹), ne correspondaient ni à l'optimum énergétique (billes de 0,375 mm à une vitesse de 8 m.s⁻¹), ni à celles de libération sélective des métabolites.

Par la suite, le modèle de stress reformulé pour les microalgues a également été validé pour la microalgue *C. sorokiniana*. La récupération de l'amidon dans le culot et des pigments et protéines dans le surnageant de broyats centrifugés avec des conditions douces (3000 g, 5 min) a été étudié. Les conditions de broyage les plus rapides (billes de 0,4 mm à 14 m.s⁻¹) ont conduit à une miniaturisation des débris cellulaires. Une zone intermédiaire d'énergie de stress (6.10^{-4} - 3.10^{-4} J) correspondant à des tailles de billes entre (0,6-0,9 mm) était mieux adaptée pour une consommation d'énergie modérée et une meilleure récupération de l'amidon par centrifugation en termes de rendement et de pureté.

Dans la dernière partie de la thèse, le modèle de stress a permis de transposer les résultats de broyage d'une échelle laboratoire (600 ml) à l'échelle pilote (10 l). Les paramètres conservés dans le changement d'échelle étaient : l'énergie de stress *SE*, la fréquence de stress *SF* et le temps de séjour. Les performances étaient comparables avec une cinétique légèrement plus faible dans le broyeur pilote (écart de 17 %). Etant donné la précision de la détermination des cinétiques (~20 % d'incertitude relative) et les hypothèses simplificatrices utilisées (utilisation de valeurs caractéristiques de *SF* et *SE* au lieu des valeurs moyennes effectives), la transposition a été jugée satisfaisante. Une optimisation de la consommation spécifique d'énergie a été faite en augmentant la concentration en *MS* jusqu'à 100 g.l⁻¹. L'extrapolation des résultats obtenus à l'échelle laboratoire avec la consommation énergétique du broyeur pilote a permis d'estimer une consommation spécifique minimale de 0,60 kWh.kg_{MS}⁻¹ pour obtenir un taux de destruction de 70 % avec *N. oceanica* en 6 min de traitement à 8 m.s⁻¹. Il est donc envisageable de réduire la

consommation spécifique à environ 10 % de la valeur énergétique de la biomasse. Cependant, la capacité de production est améliorée de (11,4 kg_{MS}.h⁻¹ à 70 %) en augmentant la vitesse à 14 m.s⁻¹ au détriment de la consommation énergétique. Un compromis doit donc être fait entre capacité de production et consommation spécifique d'énergie. Dans les conditions étudiées les modes opératoires de recirculation et pendule ont montré des efficacités similaires. Le mode de recirculation qui est plus simple à mettre en œuvre est donc conseillé.

2. Perspectives :

Le travail présenté a mis au point deux outils méthodologiques pour étudier le broyage des microalgues : l'automatisation du comptage par microscopie couplée à l'analyse d'image et la prédiction des cinétiques de destruction avec le modèle de stress.

Pour une meilleure précision dans l'analyse de taille de cellules très petites telles que *N. oceanica*, des cellules de numération permettant de plus grands grossissements pourront être utilisées. De plus, afin de limiter la variabilité des résultats de comptage selon l'expérimentateur, un marquage colorimétrique des cellules pourra permettre de distinguer les cellules apparemment intactes dont les parois ont été perméabilisées par des chocs par exemple des cellules dont les parois sont intègres.

L'étude a montré pour des microalgues sphériques une destruction granulo-sélective : les cinétiques des cellules les plus grosses étaient plus rapides que celles des cellules les plus petites. Ce comportement pourra être vérifié pour des cellules avec d'autres morphologies. Aucun lien direct entre sélectivité selon la taille et récupération de métabolites n'a pu être établi. Il aurait fallu avoir en parallèle avec la taille des cellules, les différences de composition. De plus, une étude de la composition des parois cellulaires selon la taille des cellules pourrait permettre de comprendre ces différences de fragilités. L'étude de la résistance des parois cellulaires pour les différentes classes par microscopie à force atomique pourrait également permettre de corréler le comportement micromécanique avec la fragilité cellulaire dans un procédé de destruction mécanique.

La modélisation de l'hydrodynamique avec des suspensions concentrées pourra être faite par un dosage direct des sels par chromatographie ionique pour la détermination de la DTS. Cela permettrait de valider le modèle avec des suspensions plus concentrées et aussi d'améliorer le broyage ces conditions particulière d'utilisation. Des mesures de viscosités des suspensions pourront alors être couplées à l'étude hydrodynamique, (prenant en compte vitesse d'agitation et débit d'alimentation, afin de déterminer les conditions particulières conduisant au tassement des billes.

Le broyage à grande échelle a été fait uniquement avec des suspensions diluées. Pour permettre une transposition automatique des résultats entre les deux broyeurs, il faudrait

Conclusion générale

déterminer expérimentalement un ratio entre les coefficients de transfert énergétique des deux échelles. Le broyeur de laboratoire pourra par exemple être équipé pour mesurer le moment du couple de l'agitateur selon les conditions expérimentales. On peut également envisager de déterminer les distributions des fréquences de stress et d'énergie de stress par des simulations numériques. Cela permettrait d'utiliser le modèle de stress amélioré pour une meilleure précision de l'extrapolation.

Références

- Angles, E., Jaouen, P., Pruvost, J., Marchal, L., 2017. Wet lipid extraction from the microalga *Nannochloropsis* sp.: Disruption, physiological effects and solvent screening. *Algal Res.* 21, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.005>
- Asyraf Kassim, M., Aziz Rashid, M., Halim, R., 2017. Towards Biorefinery Production of Microalgal Biofuels and Bioproducts: Production of Acetic Acid from the Fermentation of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis suecica* Hydrolysates. <https://doi.org/10.4236/gsc.2017.72012>
- Azaman, S.N.A., Nagao, N., Yusoff, F.M., Tan, S.W., Yeap, S.K., 2017. A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ* 5, e3473. <https://doi.org/10.7717/peerj.3473>
- Balasubramanian, R.K., Yen Doan, T.T., Obbard, J.P., 2013. Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chem. Eng. J.* 215–216, 929–936. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.063>
- Balasubramanian, S., Allen, J.D., Kanitkar, A., Boldor, D., 2011. Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. *Bioresour. Technol.* 102, 3396–3403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.119>
- Balasundaram, B., Pandit, A.B., 2001. Selective release of invertase by hydrodynamic cavitation. *Biochem. Eng. J.* 8, 251–256. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00114-0)
- Balasundaram, B., Skill, S.C., Llewellyn, C.A., 2012. A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. *Biochem. Eng. J.* 69, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.010>
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M., 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 41, 1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>
- Becker, M., Kwade, A., Schwedes, J., 2001. Stress intensity in stirred media mills and its effect on specific energy requirement. *Int. J. Miner. Process.* 61, 189–208. [https://doi.org/10.1016/S0301-7516\(00\)00037-5](https://doi.org/10.1016/S0301-7516(00)00037-5)
- Beinert, S., Fragnière, G., Schilde, C., Kwade, A., 2017. Multiscale simulation of fine grinding and dispersing processes: Stressing probability, stressing energy and resultant breakage rate. *Adv. Powder Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.apt.2017.11.034>
- Beinert, S., Fragnière, G., Schilde, C., Kwade, A., 2015. Analysis and modelling of bead contacts in wet-operating stirred media and planetary ball mills with CFD–DEM simulations. *Chem. Eng. Sci.* 134, 648–662. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.05.063>
- Beyerinck, M.W., 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Bot. Ztg.*
- Bilgili, E., Yepes, J., Scarlett, B., 2006. Formulation of a non-linear framework for population balance modeling of batch grinding: Beyond first-order kinetics. *Chem. Eng. Sci.* 61, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.060>
- Bisova, K., Zachleder, V., 2014. Cell-cycle regulation in green algae dividing by multiple fission. *J. Exp. Bot.* 65, 2585–2602. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert466>
- Blecher, L., Schwedes, J., 1996. Energy distribution and particle trajectories in a grinding chamber of a stirred ball mill. *Comminution* 44–45, 617–627. [https://doi.org/10.1016/0301-7516\(95\)00070-4](https://doi.org/10.1016/0301-7516(95)00070-4)
- Bonnet, S., Webb, E.A., Panzeca, C., Karl, D.M., Capone, D.G., Wilhelmy, S.A.S., 2010. Vitamin B12 excretion by cultures of the marine cyanobacteria *Crocospaera* and *Synechococcus*. *Limnol. Oceanogr.* 55, 1959–1964.
- Breitung-Faes, S., 2017. Estimation of product relating energy of wet operated stirred media mills in terms of process transfer to other mill geometries and sizes. *SI Comminution* 16, 103–104, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2016.08.008>

- Breitung-Faes, S., Kwade, A., 2014. Use of an Enhanced Stress Model for the Optimization of Wet Stirred Media Milling Processes. *Chem. Eng. Technol.* 37, 819–826. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300686>
- Breitung-Faes, S., Kwade, A., 2013. Prediction of energy effective grinding conditions. *SI Comminution* 43–44, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.07.015>
- Brown, M.R., Farmer, C.L., 1994. Riboflavin content of six species of microalgae used in mariculture. *J. Appl. Phycol.* 6, 61–65. <https://doi.org/10.1007/BF02185905>
- Bunge, F., Pietzsch, M., Müller, R., Syldatk, C., 1992. Mechanical disruption of *Arthrobacter* sp. DSM 3747 in stirred ball mills for the release of hydantoin-cleaving enzymes. *Chem. Eng. Sci.* 47, 225–232. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)80216-Y](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)80216-Y)
- Byreddy, A.R., Barrow, C.J., Puri, M., 2016. Bead milling for lipid recovery from thraustochytrid cells and selective hydrolysis of *Schizochytrium* DT3 oil using lipase. *Bioresour. Technol.* 200, 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.019>
- Capece, M., Bilgili, E., Dave, R., 2011. Identification of the breakage rate and distribution parameters in a non-linear population balance model for batch milling. *Powder Technol.* 208, 195–204. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2010.12.019>
- Carullo, D., Abera, B.D., Casazza, A.A., Donsì, F., Perego, P., Ferrari, G., Pataro, G., 2018. Effect of pulsed electric fields and high pressure homogenization on the aqueous extraction of intracellular compounds from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Algal Res.* 31, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.017>
- Cell Cycle Synchronization Methods and Protocols, Springer Protocols. ed, 2011. . Gaspar Banfalvi.
- Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Juan, J.C., 2015. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Adv. Biofuels Chem. Algae* 184, 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.026>
- Chen, C.-Y., Liu, C.-C., 2018. Optimization of lutein production with a two-stage mixotrophic cultivation system with *Chlorella sorokiniana* MB-1. *Bioresour. Technol.* 262, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.024>
- Chen, C.-Y., Lu, I.-C., Nagarajan, D., Chang, C.-H., Ng, I.-S., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2018a. A highly efficient two-stage cultivation strategy for lutein production using heterotrophic culture of *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12. *Bioresour. Technol.* 253, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.027>
- Chen, C.-Y., Nagarajan, D., Cheah, W.Y., 2018b. Eicosapentaenoic acid production from *Nannochloropsis oceanica* CY2 using deep sea water in outdoor plastic-bag type photobioreactors. *Bioresour. Technol.* 253, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.102>
- Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.-J., Chang, J.-S., 2017. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour. Technol.* 229, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Chisti, Y., 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol.* 26, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- Chisti, Y., Moo-Young, M., 1986. Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 194–204. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90087-6)
- Coons, J.E., Kalb, D.M., Dale, T., Marrone, B.L., 2014. Getting to low-cost algal biofuels: A monograph on conventional and cutting-edge harvesting and extraction technologies. *Algal Res.* 6, 250–270. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.08.005>
- Coustets, M., Joubert-Durigneux, V., Hérault, J., Schoefs, B., Blanckaert, V., Garnier, J.-P., Teissié, J., 2015. Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *BIOELECTRICS* 2013 103, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.022>
- CRAIGIE, R.A., CAVALIER-SMITH, T., 1982. Cell Volume and the Control of the *Chlamydomonas* Cell Cycle. *J. Cell Sci.* 54, 173–191.

- Currie, J.A., Dunnill, P., Lilly, M.D., 1972. Release of protein from Bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. *Biotechnol. Bioeng.* 14, 725–736. <https://doi.org/10.1002/bit.260140504>
- Dassey, A.J., Theegala, C.S., 2013. Harvesting economics and strategies using centrifugation for cost effective separation of microalgae cells for biodiesel applications. *Bioresour. Technol.* 128, 241–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.061>
- Davis, R., Aden, A., Pienkos, P.T., 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production. *Spec. Issue Energy Algae Curr. Status Future Trends* 88, 3524–3531. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.04.018>
- de Carvalho, R.M., Tavares, L.M., 2013. Predicting the effect of operating and design variables on breakage rates using the mechanistic ball mill model. *SI Comminution* 43–44, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2012.09.008>
- de Winter, Lenneke, Cabanelas, I.T.D., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2017. The influence of day/night cycles on biomass yield and composition of *Neochloris oleoabundans*. *Biotechnol. Biofuels* 10, 104. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0762-8>
- de Winter, L., Cabanelas, I.T.D., Órfão, A.N., Vaessen, E., Martens, D.E., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., 2017. The influence of day length on circadian rhythms of *Neochloris oleoabundans*. *Algal Res.* 22, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.12.001>
- de Winter, L., Klok, A.J., Cuaresma Franco, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2013a. The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. *Algal Res.* 2, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.001>
- de Winter, L., Klok, A.J., Cuaresma Franco, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., 2013b. The synchronized cell cycle of *Neochloris oleoabundans* and its influence on biomass composition under constant light conditions. *Algal Res.* 2, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.001>
- Deconinck, N., Muylaert, K., Ivens, W., Vandamme, D., 2018. Innovative harvesting processes for microalgae biomass production: A perspective from patent literature. *Algal Res.* 31, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.01.016>
- Desai, R.K., Streefland, M., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2016. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids. *Green Chem.* 18, 1261–1267. <https://doi.org/10.1039/C5GC01301A>
- Dong, H.-P., Williams, E., Wang, D., Xie, Z.-X., Hsia, R., Jenck, A., Halden, R., Chen, F., Place, A., 2013. Responses of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 to long-term nitrogen starvation and recovery. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.113.214320>
- DONNAN, L., CARVILL, E., GILLILAND, T., JOHN, P., 1985. THE CELL-CYCLES OF *CHLAMYDOMONAS* AND *CHLORELLA*. *New Phytol.* 99, 1–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1985.tb03634.x>
- Donnan, L., John, P.C.L., 1983. Cell cycle control by timer and sizer in *Chlamydomonas*. *Nature* 304, 630.
- Doucha, J., Lívanský, K., 2008a. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>
- Doucha, J., Lívanský, K., 2008b. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 431–440. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>
- Draaisma, R.B., Wijffels, R.H., (Ellen) Slegers, P., Brentner, L.B., Roy, A., Barbosa, M.J., 2013. Food commodities from microalgae. *Food Biotechnol. • Plant Biotechnol.* 24, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>
- Enamala, M.K., Enamala, S., Chavali, M., Donepudi, J., Yadavalli, R., Kolapalli, B., Aradhyula, T.V., Velpuri, J., Kuppam, C., 2018. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 94, 49–68. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.012>

- Eskin, D., Zhupanska, O., Hamey, R., Moudgil, B., Scarlett, B., 2005. Microhydrodynamics of stirred media milling. Part. Technol. Forum Spec. Issue 156, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.04.004>
- Fu, C.-C., Hung, T.-C., Chen, J.-Y., Su, C.-H., Wu, W.-T., 2010. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresour. Technol.* 101, 8750–8754. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.100>
- Gaignard, C., Gargouch, N., Dubessay, P., Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P., 2018. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.014>
- Gao, S., Yang, J., Tian, J., Ma, F., Tu, G., Du, M., 2010. Electro-coagulation–flotation process for algae removal. *J. Hazard. Mater.* 177, 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.037>
- Garrido, F., Banerjee, U., Chisti, Y., Moo-Young, M., 1994. Disruption of a recombinant yeast for the release of β -galactosidase. *Bioseparation* 4, 319–328.
- Garz, A., Sandmann, M., Rading, M., Ramm, S., Menzel, R., Steup, M., 2012. Cell-to-Cell Diversity in a Synchronized *Chlamydomonas* Culture As Revealed by Single-Cell Analyses. *Biophys. J.* 103, 1078–1086. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.026>
- Gerde, J.A., Montalbo-Lomboy, M., Yao, L., Grewell, D., Wang, T., 2012. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresour. Technol.* 125, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110>
- Gifuni, I., Olivieri, G., Pollio, A., Marzocchella, A., 2018. Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: The effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation. *New Biotechnol.* 41, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.12.003>
- Gifuni, I., Olivieri, G., Russo Krauss, I., D'Errico, G., Pollio, A., Marzocchella, A., 2017. Microalgae as new Sources of Starch: Isolation and Characterization of Microalgal Starch Granules. *Chem. Eng. Trans.* 57. <https://doi.org/10.3303/CET1757238>
- Giwa, A., Adeyemi, I., Dindi, A., Lopez, C.G.-B., Lopresto, C.G., Curcio, S., Chakraborty, S., 2018. Techno-economic assessment of the sustainability of an integrated biorefinery from microalgae and *Jatropha*: A review and case study. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 88, 239–257. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.02.032>
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., Frey, W., 2013. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res.* 2, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.07.004>
- Gogate, P.R., Pandit, A.B., 2008. Application of Cavitation reactors for cell disruption for recovery of intracellular enzymes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 1083–1093. <https://doi.org/10.1002/jctb.1898>
- Grossman, A., 2016. Nutrient Acquisition: The Generation of Bioactive Vitamin B12 by Microalgae. *Curr. Biol.* 26, R319–R321. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.02.047>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M., Elst, K., Wijffels, R., 2017. Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella* sp. during bead milling. *Algal Res.* 25, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.033>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M.H.M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33, 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Günther, S., Gernat, D., Overbeck, A., Kampen, I., Kwade, A., 2016. Micromechanical Properties and Energy Requirements of the Microalgae *Chlorella vulgaris* for Cell Disruption. *Chem. Eng. Technol.* 39, 1693–1699. <https://doi.org/10.1002/ceat.201400632>
- Hadiyanto, Sutrisnorhadi, Heri Sutanto, Meiny Suzery, 2016. Phycocyanin extraction from microalgae *Spirulina platensis* assisted by ultrasound irradiation: effect of time and temperature. *Songklanakarin J Sci Technol* 391–398.
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Appl. Energy* 91, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.048>

- Haque, S., Khan, S., Wahid, M., Mandal, R.K., Tiwari, D., Dar, S.A., Paul, D., Areeshi, M.Y., Jawed, A., 2016. Modeling and optimization of a continuous bead milling process for bacterial cell lysis using response surface methodology. *RSC Adv.* 6, 16348–16357. <https://doi.org/10.1039/C5RA26893A>
- Heim, A., Kamionowska, U., Solecki, M., 2007. The effect of microorganism concentration on yeast cell disruption in a bead mill. *Future Food Eng. Pap. 2nd Int. Symp. CIGR Sect. VI Future Food Eng.* 83, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.047>
- Heo, J., Shin, D.-S., Cho, K., Cho, D.-H., Lee, Y.J., Kim, H.-S., 2018. Indigenous microalga *Parachlorella* sp. JD-076 as a potential source for lutein production: Optimization of lutein productivity via regulation of light intensity and carbon source. *Algal Res.* 33, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.029>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
- Jayasundara, C.T., Yang, R.Y., Yu, A.B., Rubenstein, J., 2010. Effects of disc rotation speed and media loading on particle flow and grinding performance in a horizontal stirred mill. *Int. J. Miner. Process.* 96, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2010.07.006>
- Jubeau, S., 2012. Application du concept de bioraffinerie à la valorisation de la microalgue *Porphyridium cruentum*.
- Kandilian, R., Soulies, A., Pruvost, J., Rousseau, B., Legrand, J., Pilon, L., 2016. Simple method for measuring the spectral absorption cross-section of microalgae. *Chem. Eng. Sci.* 146, 357–368. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2016.02.039>
- Keris-Sen, U.D., Sen, U., Soydemir, G., Gurol, M.D., 2014. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresour. Technol.* 152, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.018>
- Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O.N., Gayen, K., Bhowmick, T.K., 2018. Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food Bioprod. Process.* 110, 60–84. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.02.002>
- Khoo, H.H., Sharratt, P.N., Das, P., Balasubramanian, R.K., Naraharisetti, P.K., Shaik, S., 2011. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. *Bioresour. Technol.* 102, 5800–5807. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.055>
- Kim, D., Kim, E.K., Koh, H.G., Kim, K., Han, J.-I., Chang, Y.K., 2017. Selective removal of rotifers in microalgae cultivation using hydrodynamic cavitation. *Algal Res.* 28, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.026>
- Kim, D.-Y., Oh, Y.-K., Park, J.-Y., Kim, B., Choi, S.-A., Han, J.-I., 2015. An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. *Bioresour. Technol.* 191, 469–474. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.020>
- Kim, S., Lee, Y., Hwang, S.-J., 2013. Removal of nitrogen and phosphorus by *Chlorella sorokiniana* cultured heterotrophically in ammonia and nitrate. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85, 511–516. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.025>
- Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., Miklavčič, D., 2015. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 33, 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002>
- Koutra, E., Grammatikopoulos, G., Kornaros, M., 2018. Selection of microalgae intended for valorization of digestate from agro-waste mixtures. *Waste Manag.* 73, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.12.030>
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D., Huss, V., Rohr, T., Wolf, M., 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-43-5-529.1>
- Kula, M.-R., Schütte, H., 1987. Purification of Proteins and the Disruption of Microbial Cells. *Biotechnol. Prog.* 3, 31–42. <https://doi.org/10.1002/btpr.5420030107>

- Kumar, K., Banerjee, D., Das, D., 2014. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour. Technol.* 152, 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.098>
- Kumar, P.S., Pandit, A.B., 1999. Modeling Hydrodynamic Cavitation. *Chem. Eng. Technol.* 22, 1017–1027. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4125\(199912\)22:12<1017::AID-CEAT1017>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4125(199912)22:12<1017::AID-CEAT1017>3.0.CO;2-L)
- Kurniawati, H.A., Ismadji, S., Liu, J.C., 2014. Microalgae harvesting by flotation using natural saponin and chitosan. *Bioresour. Technol.* 166, 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.079>
- Kwade, A., 2004. Mill selection and process optimization using a physical grinding model. *Spec. Issue Suppl. Comminution* 2002 74, S93–S101. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2004.07.027>
- Kwade, A., 2003. A Stressing Model for the Description and Optimization of Grinding Processes. *Chem. Eng. Technol.* 26, 199–205. <https://doi.org/10.1002/ceat.200390029>
- Kwade, A., 1999a. Determination of the most important grinding mechanism in stirred media mills by calculating stress intensity and stress number. *Powder Technol.* 105, 382–388. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(99\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(99)00162-X)
- Kwade, A., 1999b. Determination of the most important grinding mechanism in stirred media mills by calculating stress intensity and stress number. *Powder Technol.* 105, 382–388. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(99\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(99)00162-X)
- Kwade, A., 1999c. Wet comminution in stirred media mills? research and its practical application. *Powder Technol.* 105, 14–20. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(99\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(99)00113-8)
- Kwade, A., Blecher, L., Schwedes, J., 1996. Motion and stress intensity of grinding beads in a stirred media mill. Part 2: Stress intensity and its effect on comminution. *Powder Technol.* 86, 69–76. [https://doi.org/10.1016/0032-5910\(95\)03039-5](https://doi.org/10.1016/0032-5910(95)03039-5)
- Kwade, A., Schwedes, J., 2007. Chapter 6 Wet Grinding in Stirred Media Mills, in: Agba D. Salman, M.G. and M.J.H. (Ed.), *Handbook of Powder Technology*. Elsevier Science B.V., pp. 251–382.
- Kwade, A., Schwedes, J., 2002. Breaking characteristics of different materials and their effect on stress intensity and stress number in stirred media mills. *Spec. Issue Honour Prof Jimbo* 122, 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(01\)00406-5](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(01)00406-5)
- Lam, G.P. 't, Postma, P.R., Fernandes, D.A., Timmermans, R.A.H., Vermuë, M.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., Olivieri, G., 2017. Pulsed Electric Field for protein release of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Neochloris oleoabundans*. *Algal Res.* 24, 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.03.024>
- Laurens, L.M.L., Dempster, T.A., Jones, H.D.T., Wolfrum, E.J., Van Wycken, S., McAllister, J.S.P., Rencenberger, M., Parchert, K.J., Gloe, L.M., 2012. Algal Biomass Constituent Analysis: Method Uncertainties and Investigation of the Underlying Measuring Chemistries. *Anal. Chem.* 84, 1879–1887. <https://doi.org/10.1021/ac202668c>
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2015. Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *J. Appl. Phycol.* 27, 1881–1889. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0483-3>
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2013. Force and energy requirement for microalgal cell disruption: An atomic force microscope evaluation. *Bioresour. Technol.* 128, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.032>
- Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J., 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Int. Conf. Lignocellul. Ethanol* 46, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Lee, J., Cho, D.-H., Ramanan, R., Kim, B.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S., 2013. Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 131, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.130>

- 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. *Suppl. Issue Recent Dev. Biomass Convers. Technol.* 101, S75–S77. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.058>
- Lee, S.Y., Cho, J.M., Chang, Y.K., Oh, Y.-K., 2017. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *SIAlgal Biorefinery* 244, 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Lee, W.C., Bhagat, A.A., Lim, C.T., 2014. High-Throughput Synchronization of Mammalian Cell Cultures by Spiral Microfluidics, in: *Animal Cell Biotechnology, Methods in Molecular Biology*. pp. 3–13.
- Li, Y., Ghasemi Naghdi, F., Garg, S., Adarme-Vega, T.C., Thurecht, K.J., Ghafor, W.A., Tannock, S., Schenk, P.M., 2014. A comparative study: the impact of different lipid extraction methods on current microalgal lipid research. *Microb. Cell Factories* 13, 14. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-14>
- Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., Lan, C.Q., 2008. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 629–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>
- Limon-Lason J., Hoare M., Orsborn C. B., Doyle D. J., Dunnill P., 1979. Reactor properties of a high-speed bead mill for microbial cell rupture. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 745–774. <https://doi.org/10.1002/bit.260210503>
- Lindberg, C., Akroyd, J., Kraft, M., 2017. Developing breakage models relating morphological data to the milling behaviour of flame synthesised titania particles. *Chem. Eng. Sci.* 166, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.03.016>
- Luengo, E., Martínez, J.M., Bordetas, A., Álvarez, I., Raso, J., 2015. Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*. *Appl. PEF FOOD Process.* 29, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.02.012>
- Maeda, Y., Yoshino, T., Matsunaga, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., 2018. Marine microalgae for production of biofuels and chemicals. *Energy Biotechnol. • Environ. Biotechnol.* 50, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.11.018>
- Martínez, J.M., Luengo, E., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J., 2017. C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Artrosphira platensis*. *Microalgae Seaweeds Potential Source Valuab. Nutr. Food Addit. Nutraceuticals Hum. Anim. Consum.* 99, 1042–1047. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.09.029>
- Maruyama, Y., Yanagita, T., 1956. PHYSICAL METHODS FOR OBTAINING SYNCHRONOUS CULTURE OF *ESCHERICHIA COLI*. *J. Bacteriol.* 71, 542–546.
- Mayerhoff, Z.D.V.L., Franco, T.T., Roberto, I.C., 2008. A study of cell disruption of *Candida mogii* by glass bead mill for the recovery of xylose reductase. *Sep. Purif. Technol.* 63, 706–709. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.06.019>
- McMillan, J.R., Watson, I.A., Ali, M., Jaafar, W., 2013. Evaluation and comparison of algal cell disruption methods: Microwave, waterbath, blender, ultrasonic and laser treatment. *Appl. Energy* 103, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.020>
- Middelberg, A.P.J., 1995. Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 13, 491–551. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02007-P](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02007-P)
- Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Ación Fernández, F., Robles Medina, A., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol. Adv.* 20, 491–515. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Montalescot, V., 2015. Extraction de lipides neutres et de pigments de microalgues par un procédé intégrant destruction cellulaire et filtration membranaire. Université de Nantes, Laboratoire GEPEA.
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., Marchal, L., 2015a. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>

- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., Marchal, L., 2015b. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>
- Moreno-Garcia, L., Adjallé, K., Barnabé, S., Raghavan, G.S.V., 2017. Microalgae biomass production for a biorefinery system: Recent advances and the way towards sustainability. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76, 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.024>
- Murwanashyaka, T., Shen, L., Ndayambaje, J.D., Wang, Y., He, N., Lu, Y., 2017. Kinetic and transcriptional exploration of *Chlorella sorokiniana* in heterotrophic cultivation for nutrients removal from wastewaters. *Wastewater Algae Oppor. Chall. Long Term Sustain.* 24, 467–476. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.002>
- Neerad Phansalkar, Sumit More, Ashish Sabale, Madhuri Joshi, 2011. Adaptive local thresholding for detection of nuclei in diversity stained cytology images, in: 2011 International Conference on Communications and Signal Processing. Presented at the 2011 International Conference on Communications and Signal Processing, pp. 218–220. <https://doi.org/10.1109/ICCSP.2011.5739305>
- Nwokoagbara, E., Olaleye, A.K., Wang, M., 2015. Biodiesel from microalgae: The use of multi-criteria decision analysis for strain selection. *Fuel* 159, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.074>
- Olmstead, I.L.D., Kentish, S.E., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2013. Low solvent, low temperature method for extracting biodiesel lipids from concentrated microalgal biomass. *Bioresour. Technol.* 148, 615–619. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.022>
- OriginOil, 2010. Algae Harvesting, Dewatering and Extraction a breakthrough technology to transform algae into oil.
- Ota, S., Oshima, K., Yamazaki, T., Kim, S., Yu, Z., Yoshihara, M., Takeda, K., Takeshita, T., Hirata, A., Bišová, K., Zachleder, V., Hattori, M., Kawano, S., 2016. Highly efficient lipid production in the green alga *Parachlorella kessleri*: draft genome and transcriptome endorsed by whole-cell 3D ultrastructure. *Biotechnol. Biofuels* 9, 13. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0424-2>
- Pan, Z., Huang, Y., Wang, Y., Wu, Z., 2017. Disintegration of *Nannochloropsis* sp. cells in an improved turbine bead mill. *Bioresour. Technol.* 245, 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.146>
- Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Marchal, L., Jubeau, S., Lebovka, N., Vorobiev, E., 2015. Pulsed electric field assisted extraction of nutritionally valuable compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. using the binary mixture of organic solvents and water. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.11.002>
- Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., 2008. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 99, 7393–7396. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.028>
- Peau, J., Werthmüller, K., Senger, H., 1971. Permanent automatic synchronization of micro algae achieved by photoelectrically controlled dilution. *Arch. Für Mikrobiol.* 75, 338–345. <https://doi.org/10.1007/BF00407695>
- Phong, W.N., Le, C.F., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., 2017a. Extractive disruption process integration using ultrasonication and an aqueous two-phase system for protein recovery from *Chlorella sorokiniana*. *Eng. Life Sci.* 17, 357–369. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600133>
- Phong, W.N., Show, P.L., Le, C.F., Tao, Y., Chang, J.-S., Ling, T.C., 2018. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. *Biochem. Eng. J.* 135, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>
- Phong, W.N., Show, P.L., Ling, T.C., Juan, J.C., Ng, E.-P., Chang, J.-S., 2017b. Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Res.* <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.005>

- PIRSON, A., LORENZEN, H., 1966. SYNCHRONIZED DIVIDING ALGAE. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 439-.
- Pokora, W., Tukaj, Z., 2013. Induction time of Fe-SOD synthesis and activity determine different tolerance of two *Desmodesmus* (green algae) strains to chloridazon: A study with synchronized cultures. *Pestic. Biochem. Physiol.* 107, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.05.007>
- Posada, J.A., Brentner, L.B., Ramirez, A., Patel, M.K., 2016. Conceptual design of sustainable integrated microalgae biorefineries: Parametric analysis of energy use, greenhouse gas emissions and techno-economics. *Algal Res.* 17, 113–131. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.022>
- Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Adv. Biofuels Chem. Algae* 184, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Postma, P.R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., Olivieri, G., Ferrari, G., 2016. Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field–temperature treatment. *Bioresour. Technol.* 203, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.012>
- Postma, P.R., Suarez-Garcia, E., Safi, C., Yonathan, K., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H., Eppink, M.H.M., 2017. Energy efficient bead milling of microalgae: Effect of bead size on disintegration and release of proteins and carbohydrates. *Bioresour. Technol.* 224, 670–679. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.071>
- Pruvost, J., Cornet, J., 2012. Knowledge models for the engineering and optimization of photobioreactors.
- Pruvost, J., Cornet, J., Goetz, V., Legrand, J., 2011. Modeling dynamic functioning of rectangular photobioreactors in solar conditions. *AIChE* 57, 1947–1960. <https://doi.org/10.1002/aic.12389>
- Pruvost, J., Le Borgne, F., Artu, A., Cornet, J.-F., Legrand, J., 2016. Chapter Five - Industrial Photobioreactors and Scale-Up Concepts, in: Legrand, J. (Ed.), *Advances in Chemical Engineering*. Academic Press, pp. 257–310. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.002>
- Pruvost, J., Van Vooren, G., Cogne, G., Legrand, J., 2009. Investigation of biomass and lipids production with *Neochloris oleoabundans* in photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 100, 5988–5995. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.004>
- Radziszewski, P., 2015. Shear based stirred mill power model – An adimensional analysis. *Spec. Issue Comminution* 73, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.12.028>
- Rashid, N., Rehman, M.S.U., Han, J.-I., 2013. Use of chitosan acid solutions to improve separation efficiency for harvesting of the microalga *Chlorella vulgaris*. *Chem. Eng. J.* 226, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.062>
- Renault, F., Sancey, B., Badot, P.-M., Crini, G., 2009. Chitosan for coagulation/flocculation processes – An eco-friendly approach. *Eur. Polym. J.* 45, 1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.027>
- Reyes, F.A., Mendiola, J.A., Suárez-Alvarez, S., Ibañez, E., del Valle, J.M., 2016. Adsorbent-assisted supercritical CO₂ extraction of carotenoids from *Neochloris oleoabundans* paste. *J. Supercrit. Fluids* 112, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.005>
- Ritchie, R.J., 2006. Consistent Sets of Spectrophotometric Chlorophyll Equations for Acetone, Methanol and Ethanol Solvents. *Photosynth. Res.* 89, 27–41. <https://doi.org/10.1007/s11120-006-9065-9>
- Rossignol, N., Vandanjon, L., Jaouen, P., Quéméneur, F., 1999. Membrane technology for the continuous separation microalgae/culture medium: compared performances of cross-flow microfiltration and ultrafiltration. *Aquac. Eng.* 20, 191–208. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(99)00018-7)
- Safi, C., Cabas Rodriguez, L., Mulder, W.J., Engelen-Smit, N., Spekking, W., van den Broek, L.A.M., Olivieri, G., Sijtsma, L., 2017a. Energy consumption and water-soluble protein release by

- cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresour. Technol.* 239, 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.012>
- Safi, C., Olivieri, G., Campos, R.P., Engelen-Smit, N., Mulder, W.J., van den Broek, L.A.M., Sijtsma, L., 2017b. Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. *Bioresour. Technol.* 225, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.068>
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., Vaca-Garcia, C., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Sauvola, J., Pietikäinen, M., 2000. Adaptive document image binarization. *Pattern Recognit.* 33, 225–236. [https://doi.org/10.1016/S0031-3203\(99\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0031-3203(99)00055-2)
- Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S., Gressel, J., 2012. Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to bulk algal production. *Biotechnol. Adv.* 30, 1023–1030. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.011>
- Schütte, H., Kroner, K.H., Hustedt, H., Kula, M.-R., 1983. Experiences with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 143–148. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(83\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(83)90050-9)
- Schütte, H., Kula, M.-R., 1988. Analytical disruption of microorganisms in a mixer mill. *Enzyme Microb. Technol.* 10, 552–558. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(88\)90049-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(88)90049-X)
- Schwedes, J., Bunge, F., 1992. Comminution and transport behaviour in agitated ball mills. *Adv. Powder Technol.* 55–70.
- Schwenzfeier, A., Wierenga, P.A., Gruppen, H., 2011. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. *Bioresour. Technol.* 102, 9121–9127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.046>
- Senger, H., Bishop, N.I., 1969. CHAPTER 9 - Light-Dependent Formation of Nucleic Acids and Its Relation to the Induction of Synchronous Cell Division in *Chlorella*, in: CAMERON, G.M.P.L.W.L. (Ed.), *The Cell Cycle*. Academic Press, pp. 179–202.
- Senger, H., Pfau, J., Werthmüller, K., 1972. Chapter 9 Continuous Automatic Cultivation of Homocontinuous and Synchronized Microalgae¹, in: David M. Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*. Academic Press, pp. 301–323.
- Seo, J.Y., Praveenkumar, R., Kim, B., Seo, J.-C.S., Park, J.-Y., Na, J.-G., 2016. Downstream integration of microalgae harvesting and cell disruption by means of cationic surfactant-decorated Fe₃O₄ nanoparticles. *Green Chem.* 18, 3981–3989. <https://doi.org/10.3039/c6gc00904b>
- Shriwastav, A., Gupta, S.K., Ansari, F.A., Rawat, I., Bux, F., 2014. Adaptability of growth and nutrient uptake potential of *Chlorella sorokiniana* with variable nutrient loading. *Bioresour. Technol.* 174, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.149>
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Souliès, A., Pruvost, J., Legrand, J., Castelain, C., Burghélea, T., 2013. Rheological properties of suspensions of the green microalga *Chlorella vulgaris* at various volume fractions. <https://doi.org/10.1007/s00397-013-0700-z>
- Spiden, E.M., Scales, P.J., Yap, B.H.J., Kentish, S.E., Hill, D.R.A., Martin, G.J.O., 2015. The effects of acidic and thermal pretreatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp. *Algal Res.* 7, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.006>
- Spiden, E.M., Yap, B.H.J., Hill, D.R.A., Kentish, S.E., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2013. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresour. Technol.* 140, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.074>

- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stender, H.-H., Kwade, A., Schwedes, J., 2004. Stress energy distribution in different stirred media mill geometries. *Spec. Issue Suppl. Comminution 2002* 74, S103–S117. <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2004.07.003>
- Suarez Garcia, E., van Leeuwen, J., Safi, C., Sijtsma, L., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., van den Berg, C., 2018. Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications. *Bioresour. Technol.* 268, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.131>
- Suda, S., Atsumi, M., Miyashita, H., 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). *Phycologia* 41, 273–279. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-41-3-273.1>
- 't Lam, G.P., Vermuë, M.H., Eppink, M.H.M., Wijffels, R.H., van den Berg, C., 2018. Multi-Product Microalgae Biorefineries: From Concept Towards Reality. *Trends Biotechnol.* 36, 216–227. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.011>
- Taleb, A., Pruvost, J., Legrand, J., Marec, H., Le-Gouic, B., Mirabella, B., Legeret, B., Bouvet, S., Peltier, G., Li-Beisson, Y., Taha, S., Takache, H., 2015. Development and validation of a screening procedure of microalgae for biodiesel production: Application to the genus of marine microalgae *Nannochloropsis*. *Bioresour. Technol.* 177, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.068>
- TAMIYA, H., 1966. SYNCHRONOUS CULTURES OF ALGAE. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17, 1-. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.17.060166.000245>
- Tamiya, H., Iwamura, T., Shibata, K., Hase, E., Nihei, T., 1953. Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 12, 23–40. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(53\)90120-6](https://doi.org/10.1016/0006-3002(53)90120-6)
- Tan, C.H., Show, P.L., Chang, J.-S., Ling, T.C., Lan, J.C.-W., 2015. Novel approaches of producing bioenergies from microalgae: A recent review. *BioTech 2014 6th Czech-Swiss Biotechnol. Symp.* 33, 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.013>
- Toraman, O.Y., Katircioglu, D., 2011. A study on the effect of process parameters in stirred ball mill. *4th Asian Part. Technol. Symp. APT2009 - II* 22, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.ap.2010.02.018>
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Garg, M.O., 2015. Algae based biorefinery—How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.052>
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* 2, 012701. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>
- Urreta, I., Ikarán, Z., Janices, I., Ibañez, E., Castro-Puyana, M., Castañón, S., Suárez-Alvarez, S., 2014. Revalorization of *Neochloris oleoabundans* biomass as source of biodiesel by concurrent production of lipids and carotenoids. *Algal Res.* 5, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.05.001>
- U.S. DOE 2010., 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap. U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.
- Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuiné, S., Peltier, G., Pruvost, J., 2012. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* 124, 421–432. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.009>
- Vandamme, D., Foubert, I., Meesschaert, B., Muylaert, K., 2010. Flocculation of microalgae using cationic starch. *J. Appl. Phycol.* 22, 525–530. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9488-8>
- Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2013. Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Biorefineries* 135, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.135>

- Vitova, M., Zachleder, V., 2005. Points of commitment to reproductive events as a tool for analysis of the cell cycle in synchronous cultures of algae. *Folia Microbiol. (Praha)* 50, 141–149. <https://doi.org/10.1007/BF02931463>
- Wang, M., Yuan, W., Jiang, X., Jing, Y., Wang, Z., 2014. Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresour. Technol.* 153, 315–321. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.054>
- Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuels Bioprod. Biorefining* 4, 287–295. <https://doi.org/10.1002/bbb.215>
- Woodrow, J.R., Quirk, A.V., 1982. Evaluation of the potential of a bead mill for the release of intracellular bacterial enzymes. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 385–389. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90067-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90067-9)
- Wu, C., Xiao, Y., Lin, W., Li, J., Zhang, S., Zhu, J., Rong, J., 2017. Aqueous enzymatic process for cell wall degradation and lipid extraction from *Nannochloropsis* sp. *Bioresour. Technol.* 223, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.063>
- Xie, Y., Ho, S.-H., Chen, C.-N.N., Chen, C.-Y., Jing, K., Ng, I.-S., Chen, J., Chang, J.-S., Lu, Y., 2016. Disruption of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 in high pressure homogenization as a prelude to carotenoids extraction. *Biochem. Eng. J.* 109, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.003>
- Xu, Y., Purton, S., Baganz, F., 2013. Chitosan flocculation to aid the harvesting of the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Bioresour. Technol.* 129, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.068>
- Yamamoto, M., Kurihara, I., Kawano, S., 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the *Chlorellaceae*, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221, 766–775. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1486-8>
- Yap, B.H.J., Dumsday, G.J., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2015. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Adv. Biofuels Chem. Algae* 184, 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.049>
- Yusaf, T., Al-Juboori, R.A., 2014. Alternative methods of microorganism disruption for agricultural applications. *Appl. Energy* 114, 909–923. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.085>
- Zheng, Y., Xiao, R., Roberts, M., 2016. Polymer-enhanced enzymatic microalgal cell disruption for lipid and sugar recovery. *Algal Res.* 14, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.010>

Titre : Broyage à billes de microalgues : étude et modélisation par classes de taille, application au bioraffinage

Mots clés : microalgues, bioraffinage, destruction cellulaire, broyage à billes, modélisation, granulométrie

Résumé : Les microalgues constituent une source durable de produits de haute valeur ajoutée et pour la production de biocarburants de 3^{ème} génération. Cependant, afin que la production massive de microalgues soit économiquement viable, il faut considérer une approche de bioraffinage qui inclut la valorisation complète de la biomasse. La voie humide de bioraffinage nécessite la destruction des parois et membranes cellulaires afin de libérer les biomolécules. La méthode de destruction est cruciale puisqu'elle détermine les coûts, les rendements et la complexité des étapes de fractionnement et de purification. Le broyage à billes est une méthode mécanique de destruction cellulaire efficace, utilisable à grande échelle et qui permet une libération douce voire sélective des molécules intracellulaires.

Les mécanismes de broyage sont complexes et le grand nombre de paramètres multiplie les coûts d'optimisation des conditions opératoires. L'étude présentée consiste à développer un modèle prédictif de la cinétique de destruction cellulaire qui tient compte des spécificités des microalgues. Le modèle inclut l'effet de la taille des cellules, l'hydrodynamique dans le broyeur à billes et l'effet des paramètres opératoires. Le modèle est utilisé pour minimiser la consommation énergétique et transposer les résultats expérimentaux à grande échelle.

Title: Bead milling disruption of microalgae: study and modeling by size classes, application to biorefinery

Keywords: microalgae, biorefinery, cell disruption, bead milling, model, granulometry

Abstract: Microalgae are a sustainable feedstock for high value products and to produce 3rd generation biofuels. However, for a bulk production of microalgae it is necessary to consider a "biorefinery" approach which includes the complete valorization of the biomass. The wet route of microalgae biorefinery requires the disruption of cell walls and cell membranes to release the biomolecules. The disruption method is crucial since it determines the costs, the yields and the complexity of the fractionation and purification steps. Bead milling is an efficient mechanical cell disruption method that can be used at large scale and allows a mild or even selective release of intracellular molecules.

The disruption mechanisms are complex and the large number of parameters increases the costs of the optimization of the operating conditions. The current study is focused on developing a predictive model for the cell disruption kinetics that takes into account the specificities of microalgae. The model includes the effect of cell size, hydrodynamics in the equipment, and the effect of the operating parameters. The model is used to minimize energy consumption and for transposition of experimental results at large scale.