

Annexe 6. Biodiesel production and potential of microalgal biodiesel (excerpt)

Source : "Biodiesel from microalgae" *Biotechnology Advances*, Y. Chisti, 2007.

/.../

The typically used process for commercial production of biodiesel is explained in

Box 1. Any future production of biodiesel from microalgae is expected to use the same process. Production of methyl esters, or biodiesel, from microalgal oil has been demonstrated (*Belarbi et al., 2000*) although the product was intended for pharmaceutical use.

Box 1

Biodiesel production

Parent oil used in making biodiesel consists of triglycerides in which three fatty acid molecules are esterified with a molecule of glycerol.

In making biodiesel, triglycerides are reacted with methanol in a reaction known as transesterification or alcoholysis.

Transesterification produces methyl esters of fatty acids, that are biodiesel, and glycerol. The reaction occurs stepwise : triglycerides are first converted to diglycerides, then to monoglycerides and finally to glycerol. Transesterification requires 3 mol of alcohol for each mole of triglyceride to produce 1 mol of glycerol and 3 mol of methyl esters. The reaction is an equilibrium. Industrial processes use 6mol of methanol for each mole of triglyceride (*Fukuda et al., 2001*). This large excess of methanol ensures that the reaction is driven in the direction of methyl esters, i.e. towards biodiesel. Yield of methyl esters exceeds 98% on a weight basis (*Fukuda et al., 2001*).

Transesterification is catalyzed by acids, alkalis (*Fukuda et al., 2001; Meher et al., 2006*) and lipase enzymes (*Sharma et al., 2001*). Alkali-catalyzed transesterification is about 4000 times faster than the acid catalyzed reaction (*Fukuda et al., 2001*). Consequently, alkalis such as sodium and potassium hydroxide are commonly used as commercial catalysts at a concentration of about 1% by weight of oil.

Alkoxides such as sodium methoxide are even better catalysts than sodium

hydroxide and are being increasingly used. Use of lipases offers important advantages, but is not currently feasible because of the relatively high cost of the catalyst (*Fukuda et al., 2001*).

Alkali-catalyzed transesterification is carried out at approximately 60°C under atmospheric pressure, as methanol boils off at 65 °C at atmospheric pressure.

Under these conditions, reaction takes about 90min to complete. A higher temperature can be used in combination with higher pressure, but this is expensive. Methanol and oil do not mix, hence the reaction mixture contains two liquid phases. Other alcohols can be used, but methanol is the least expensive. To prevent yield loss

due to saponification reactions (i.e. soap formation), the oil and alcohol must be dry and the oil should have a minimum of free fatty acids. Biodiesel is recovered by repeated washing with water to remove glycerol and methanol.

Potential of microalgal biodiesel

Replacing all the transport fuel consumed in the United States with biodiesel will require 0.53 billion m³ of biodiesel annually at the current rate of consumption.

Oil crops, waste cooking oil and animal fat cannot realistically satisfy this demand. For example, meeting only half the existing U.S. transport fuel needs by biodiesel, would require unsustainably large cultivation areas for major oil crops. This is demonstrated in **Table 1**. Using the average oil yield per hectare from various crops, the cropping area needed to meet 50% of the U.S. transport fuel needs is calculated in column 3.

/.../

Comparison of some sources of biodiesel

Crop	Oil yield (L/ha)	Land area needed (M ha) ^a
Corn	172	1540
Soybean	446	594
Canola	1190	223
Jatropha	1892	140
Coconut	2689	99
Oil palm	5950	45
Microalgae ^b	136,900	2
Microalgae ^c	58,700	4.5

^a For meeting 50% of all transport fuel needs of the United States.

^b 70% oil (by wt) in biomass.

^c 30% oil (by wt) in biomass.

Improving economics of microalgal biodiesel

...

Genetic and metabolic engineering are likely to have the greatest impact on improving the economics of production of microalgal diesel (Roessler *et al.*, 1994; Dunahay *et al.*, 1996). Genetic modification of microalgae has received little attention (León-Bañares *et al.*, 2004).

Molecular level engineering can be used to potentially :

1. increase photosynthetic efficiency to enable increased biomass yield on light;
2. enhance biomass growth rate;
3. increase oil content in biomass;
4. improve temperature tolerance to reduce the expense of cooling;
5. eliminate the light saturation phenomenon (Box 2) so that growth continues to increase in response to increasing light level;
6. reduce photoinhibition (Box 2) that actually reduces growth rate at midday light intensities that occur in temperate and tropical zones; and
7. reduce susceptibility to photooxidation that damages cells.

Box 2

Light saturation and photoinhibition

Light saturation is characterized by a light saturation constant (Fig. B2), that is the intensity of light at which the specific biomass growth rate is half its maximum value, μ_{max} . Light saturation constants for microalgae tend to be much lower than the maximum sunlight level that occurs at midday. For example, the light saturation constants for microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum* are $185 \mu E m^{-2} s^{-1}$ (Mann and Myers, 1968) and $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$ (Molina Grima *et al.*, 2000), respectively. In comparison with these values, the typical midday outdoor light intensity in equatorial regions is about $2000 \mu E m^{-2} s^{-1}$. Because of light saturation, the biomass growth rate is much lower than would be possible if light saturation value could be increased substantially. Above a certain value of light intensity, a further increase in light level actually reduces the biomass growth rate (Fig. B2). This phenomenon is known as photoinhibition. Microalgae become photoinhibited at light intensities only slightly greater than the light level at which the specific growth rate peaks. Photoinhibition results from generally reversible damage to the photosynthetic apparatus, as a consequence of excessive light (Camacho Rubio *et al.*, 2003).

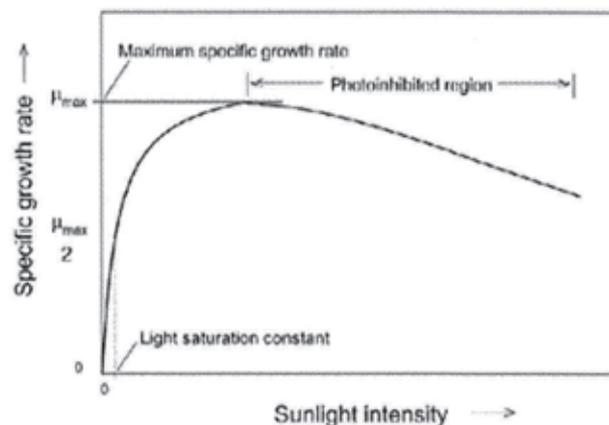


Fig. B2. Effect of light intensity on specific growth rate of microalgae.

Annexe 7. Comparison of photobioreactor and raceway production methods

Source : "Biodiesel from microalgae" *Biotechnology Advances*, Y. Chisti, 2007.

Variable	Photobioreactor facility	Raceway ponds
Annual biomass production (kg)	100,000	100,000
Volumetric productivity ($\text{kg m}^{-3} \text{d}^{-1}$)	1.535	0.117
Areal productivity ($\text{kg m}^{-2} \text{d}^{-1}$)	0.048 ^a 0.072 ^c	0.035 ^b
Biomass concentration in broth (kg m^{-3})	4.00	0.14
Dilution rate (d^{-1})	0.384	0.250
Area needed (m^2)	5681	7828
Oil yield ($\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$)	136.9 ^d 58.7 ^e	99.4 ^d 42.6 ^e
Annual CO ₂ consumption (kg)	183,333	183,333
System geometry	132 parallel tubes/unit; 80 m long tubes; 0.06 m tube diameter	978 m^2 /pond; 12 m wide, 82 m long, 0.30 m deep
Number of units	6	8

^a Based on facility area.

^b Based on actual pond area.

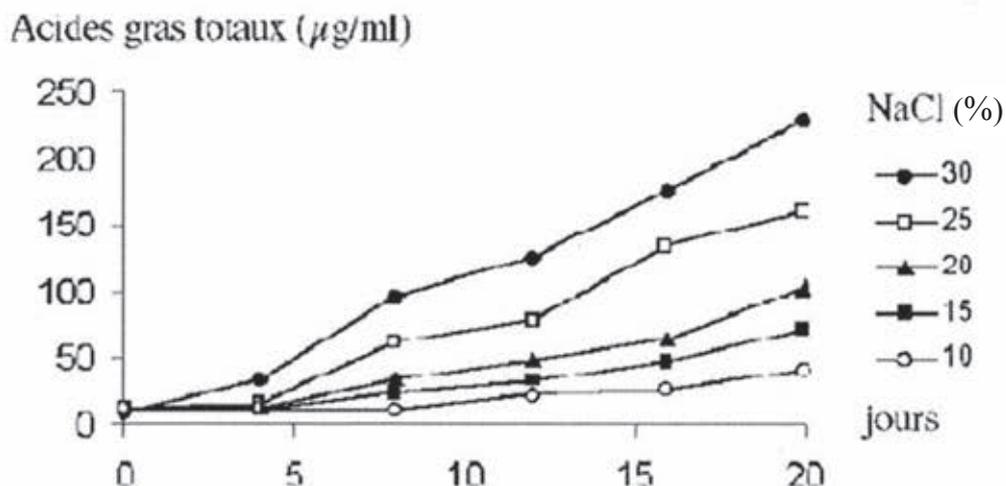
^c Based on projected area of photobioreactor tubes.

^d Based on 70% by wt oil in biomass.

^e Based on 30% by wt oil in biomass.

Annexe 8. Effet de la salinité sur la production d'acides gras totaux par les microalgues

Source : "Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras de *Dunaliella salina*" *Bulletin Pharmacie Bordeaux*, J. Riyahi, Y. Haouazine, R. Akallal, A. Mouradi, A. Creach et T. Givernaud, 2007.



Effet de la salinité sur la production d'acides gras totaux chez *Dunaliella salina* cultivée vingt jours sur le milieu Johnson modifié à 32°C en présence d'1 mM de nitrate de potassium.

Annexe 9. Procédés de récolte des microalgues

Source : "Algues, filières du futur " Livre turquoise, J. Person, 2010.

Plusieurs moyens de récolte sont alors possibles, ils répondent à deux principes de séparation bien distincts :

- le principe de séparation par différence de masse volumique des cellules par rapport à celle du milieu : les techniques de sédimentation, de floculation-décantation, de flottation et de centrifugation,
- le principe de séparation par exclusion de taille : le tamisage, les procédés à membranes pouvant utiliser la micro- ou l'ultrafiltration.

2. Sédimentation gravitaire par différence de masse volumique

Certaines souches d'algues présentent une tendance naturelle à sédimenter dès l'arrêt de toute forme de brassage du milieu. Cela facilite alors leur récolte, puisqu'il est possible de travailler sur des volumes moins importants. Le temps de décantation dépend de trois paramètres : la différence de densité entre le milieu de culture et les microalgues, la taille des microalgues, et la viscosité du milieu de culture (loi de Stokes).



Figure 15 : Différents temps de sédimentation.
(Source : Université de Wageningen)

3. Floculation-décantation

Le phénomène de floculation est provoqué en agissant sur l'état d'agrégation des cellules, ce qui facilite la décantation des microalgues. De nombreuses formes de floculations forcées sont utilisées.

La floculation chimique se réalise au moyen d'additifs chimiques liant les algues ou modifiant les interactions physico-chimiques entre elles. On peut procéder soit à l'ajout de sels de Fer (FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, ...) ou d'Aluminium ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), soit à l'ajout de polymères (anioniques ou cationiques ; synthétiques ou naturels).

La biofloculation peut être déclenchée par un changement des conditions environnantes (pH, lumière, température, carence en nutriments) entraînant un stress cellulaire générant la synthèse d'exsudats agrégeants. Elle est plus précisément appelée dans ce contexte autofloculation. La biofloculation peut aussi être entraînée par l'utilisation de populations microbiennes engendrant la synthèse d'exsudats agrégeants.

L'électrocoagulation et l'électrofloculation présentent toutes deux l'avantage de ne pas utiliser d'additifs chimiques. La première se réalise au moyen d'électrodes à base de Fer ou d'Aluminium parcourues par un courant générant la libération d'ions métalliques par oxydoréduction. La seconde présente deux voies, soit par l'utilisation d'électrodes (deux électrodes sont placées dans la suspension, anode et cathode, au contact de l'anode (+), les cellules (-) perdent leur charge et peuvent s'agglomérer) soit par ultrasons (les ultrasons génèrent des champs acoustiques, les cellules se concentrent dans les zones où le potentiel est minimum, provoquant ainsi leur agrégation).

4. Flottation

Certaines souches peuvent avoir une tendance naturelle à flotter, en particulier celles riches en lipides. Pour les autres le phénomène de flottation est produit par une action sur la

différence de masse volumique et le diamètre des cellules. Pour cela, deux modes de fonctionnement sont possibles, l'électroflottation et la flottation par air dissous (DAF).

L'électroflottation permet aux particules en suspension, ici les algues, d'être entraînées à la surface par l'action des microbulles d'hydrogène provenant de l'électrolyse des molécules d'eau. Il en résulte une couche dense à la surface contenant les algues en suspension.

/.../

Mise au point pour le traitement des eaux usées, ce n'est que bien plus tard que la méthode DAF fut considérée pour la récolte des algues. Elle consiste à faire buller de l'air tout au long de la suspension algale, permettant ainsi aux algues de flotter à la surface.

/.../

5. Centrifugation, action sur le nombre de g

La centrifugation est une technique utilisant la force centrifuge, c'est à dire l'action sur le nombre de g : l'intensité gravitationnelle, pour séparer des particules solides en suspension dans un fluide, ici les algues en suspension dans leur milieu de culture. L'appareil utilisé pour réaliser cette séparation est nommé centrifugeuse. Elle permet de séparer les éléments du mélange en le faisant tourner à grande vitesse.

/.../

6. Filtration frontale : tamisage, séparation par exclusion de taille

La filtration frontale, la plus connue, consiste à faire passer le fluide à filtrer perpendiculairement à la surface du filtre. Ce type de technologie est valable pour des « grosses » cellules, soit une taille des particules supérieure à 40 μm .

/.../

Ce procédé de récolte fonctionne sous de faibles gradients de pression (ou à vide) et présente la nécessité de racler le gâteau d'algues (ou de le structurer par ajout d'auxiliaires de filtration comme des fibres de cellulose ou de la terre de diatomées) formé à intervalles réguliers

/.../

7. Filtration tangentielle membranaire

La filtration tangentielle, au contraire, consiste à faire passer le fluide tangentiellement, c'est-à-dire parallèlement, à la surface du filtre. C'est la pression du fluide qui permet à celui-ci de traverser le filtre. Les particules, dans ce cas, restent dans le flux de circulation tangentielle, et le colmatage s'effectue ainsi beaucoup moins vite. Cependant, cette technique est réservée aux très petites particules, dont la taille est inférieure à 40 μm , soit la plupart des microalgues unicellulaires.

Dans ce contexte de récolte, une bonne rétention nécessite le recours à des membranes de micro (MF) ou d'ultrafiltration (UF) avec des pores allant de 0,5 μm à 0,02 μm (≈ 50 kDa).

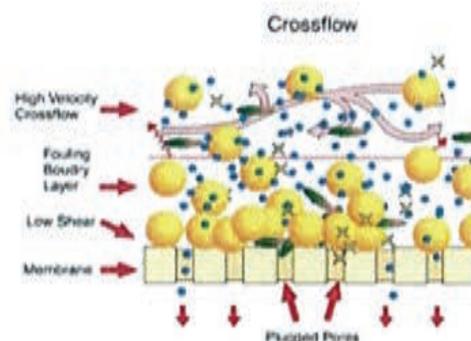


Figure 16 : Principe de la filtration tangentielle. (Source : Présentation M. Frappart / Massé / Jaouen - GEPEA-CNRS)

8. Comparaison des différents systèmes de récolte

- En fonction de leur consommation énergétique

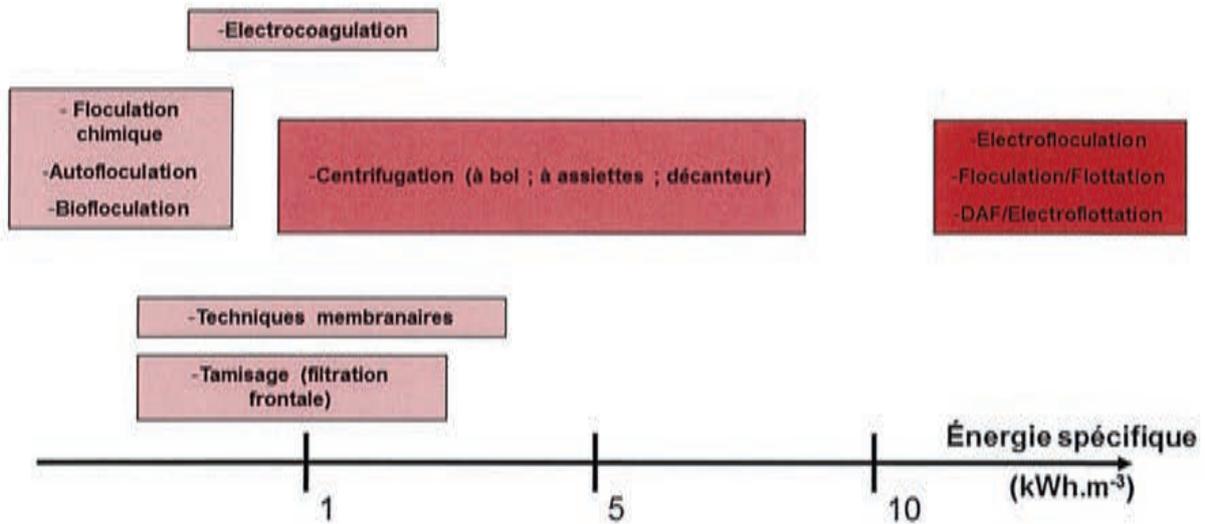


Figure 18 : Comparaison des systèmes de récolte en fonction de leur consommation énergétique (Source : Présentation M. Frappart / Massé / Jaouen - GEPEA-CNRS)

- En fonction de l'objectif d'humidité finale de la biomasse

Biomasse très humide < 5 % MS	Biomasse Humide 5 - 30 % MS
<ul style="list-style-type: none"> • Sédimentation naturelle • Flottation • Flocculation chimique • Bioflocculation • Electrocoagulation • Electroflocculation • Techniques membranaires (micro ou ultrafiltration) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tamisage • Filtration • Centrifugation

Tableau 4 : Comparaison des systèmes de récolte en fonction de leur objectif d'humidité finale (Source : Présentation M. Frappart / Massé / Jaouen - GEPEA)

Annexe 10. Modalités d'extraction lipidique à partir de microalgues

Source : "Utilisation de microalgues pour la fabrication de biocarburants "

Rapport de la Direction générale de l'Energie et du Climat, A.Wolff, 2011.

Etapes préalables à l'extraction

Après récolte et concentration, les microalgues forment alors une sorte de pâte humide. Il est possible de rajouter une étape de **séchage** avant la phase d'extraction des lipides afin de concentrer d'avantage la matière sèche.

D'autre part, les lipides sont stockés au sein de cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi. Leur extraction nécessite donc souvent une étape visant à **rompre les parois cellulaires** afin de les rendre accessibles aux solvants. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des traitements très variés : broyage à billes, sonication (éclatement par ultrasons), les micro-ondes homogénéisation, autoclavage, congélation/décongélation, utilisation de solvants organiques, chocs osmotiques, lyses enzymatiques, réactions acido-basiques. Le choix de la technique d'éclatement dépend principalement des caractéristiques cellulaires, du taux de matière sèche de la pâte et du procédé d'extraction utilisé ensuite.

Méthodes d'extraction

De très nombreux procédés d'extraction existent. Ils reposent notamment sur les propriétés physico-chimiques des molécules à extraire et sur le degré d'humidité du substrat. Il est possible de distinguer plusieurs types de traitement:

- **Les mix de solvants organiques**

Les solvants organiques sont choisis en fonction de leur polarité et de leur affinité avec les composés d'intérêt. Les combinaisons de co-solvants font partie des mix étudiés

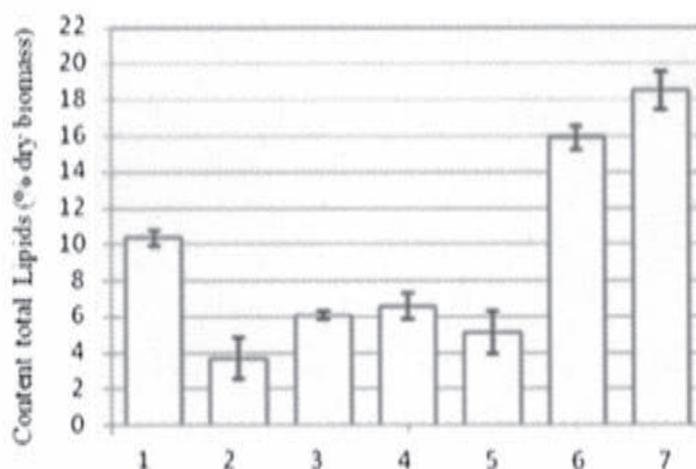


Fig. 1. Total lipid percentage in the dry biomass using different extraction methods. 1 - ethanol, 2 - hexane, 3 - chloroform:methanol (1:2), 4 - chloroform:methanol (1:2) assisted by a Potter homogenizer, 5 - chloroform:methanol (1:2) assisted by ultrasound, 6 - chloroform:methanol (2:1) assisted by a Potter homogenizer, 7 - chloroform:methanol (2:1) assisted by ultrasound.

R.R. dos Santos et al./Ultrasonics Sonochemistry 22 (2015) 95–99

- **Les procédés d'extraction en condition de haute température et haute pression**

De façon général, le mécanisme est le suivant : en condition de pression et de température élevées, les composés organiques deviennent miscibles avec le solvant. Puis, une seconde étape de diminution de la température et de la pression permet de séparer facilement le solvant et les produits extraits. Plusieurs techniques d'extraction se basant sur ce mécanisme existent :

- A l'eau sub-critique

Cette technique, utilisant de l'eau juste en dessous de la température critique et à une pression suffisamment élevée pour rester à l'état liquide (Soto et de Castro 2001), a déjà été utilisée pour l'extraction sélective de composés biologiques de végétaux et de microalgues (Herrero et al. 2006).

- Aux fluides super-critiques

Ce procédé se base sur l'augmentation de la capacité de solvation des agents d'extraction au-dessus de leur point critique. L'un des principaux agents utilisés est le CO₂

- **Les procédés biocompatibles**

Ces procédés permettent de garder les cellules vivantes lors de l'étape d'extraction.

Une technologie d'extraction des triglycérides de cellules de microalgues vivantes et faiblement concentrées (1% matière sèche) est en train de se développer, utilisant des solvants tels que le décane ou le dodécane

Annexe 11. Advantages of using microalgae derived biofuels

Source : "Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing and extractions of biofuel and co-products" (excerpt)

Renewable and Sustainable Energy Reviews, L. Brennan et P. Owende, 2010.

(1) /.../ microalgae are capable of all year round production, therefore, oil productivity of microalgae cultures exceeds the yield of the best oilseed crops, e.g. biodiesel yield of 12,000 L.ha⁻¹ for microalgae (open pond production) compared with 1190 L.ha⁻¹ for rapeseed]; (2) they grow in aqueous media, but need less water than terrestrial crops therefore reducing the load on freshwater sources; (3) microalgae can be cultivated in brackish water on non-arable land, and therefore may not incur land-use change, minimising associated environmental impacts, while not compromising the production of food, fodder and other products derived from crops ; (4) microalgae have a rapid growth potential and many species have oil content in the range of 20–50% dry weight of biomass, the exponential growth rates can double their biomass in periods as short as 3.5 h; (5) with respect to air quality maintenance and improvement, microalgae biomass production can effect biofixation of waste CO₂ (1 kg of dry algal biomass utilise about 1.83 kg of CO₂); (6) nutrients for microalgae cultivation (especially nitrogen and phosphorus) can be obtained from wastewater, therefore, apart from providing growth medium, there is dual potential for treatment of organic effluent from the agri-food industry; (7) algae cultivation does not require herbicides or pesticides application; (8) they can also produce valuable co-products such as proteins and residual biomass after oil extraction, which may be used as feed or fertilizer , or fermented to produce ethanol or methane; (9) the biochemical composition of the algal biomass can be modulated by varying growth conditions, therefore, the oil yield may be significantly enhanced, and; (10) microalgae are capable of photobiological production of 'biohydrogen'.

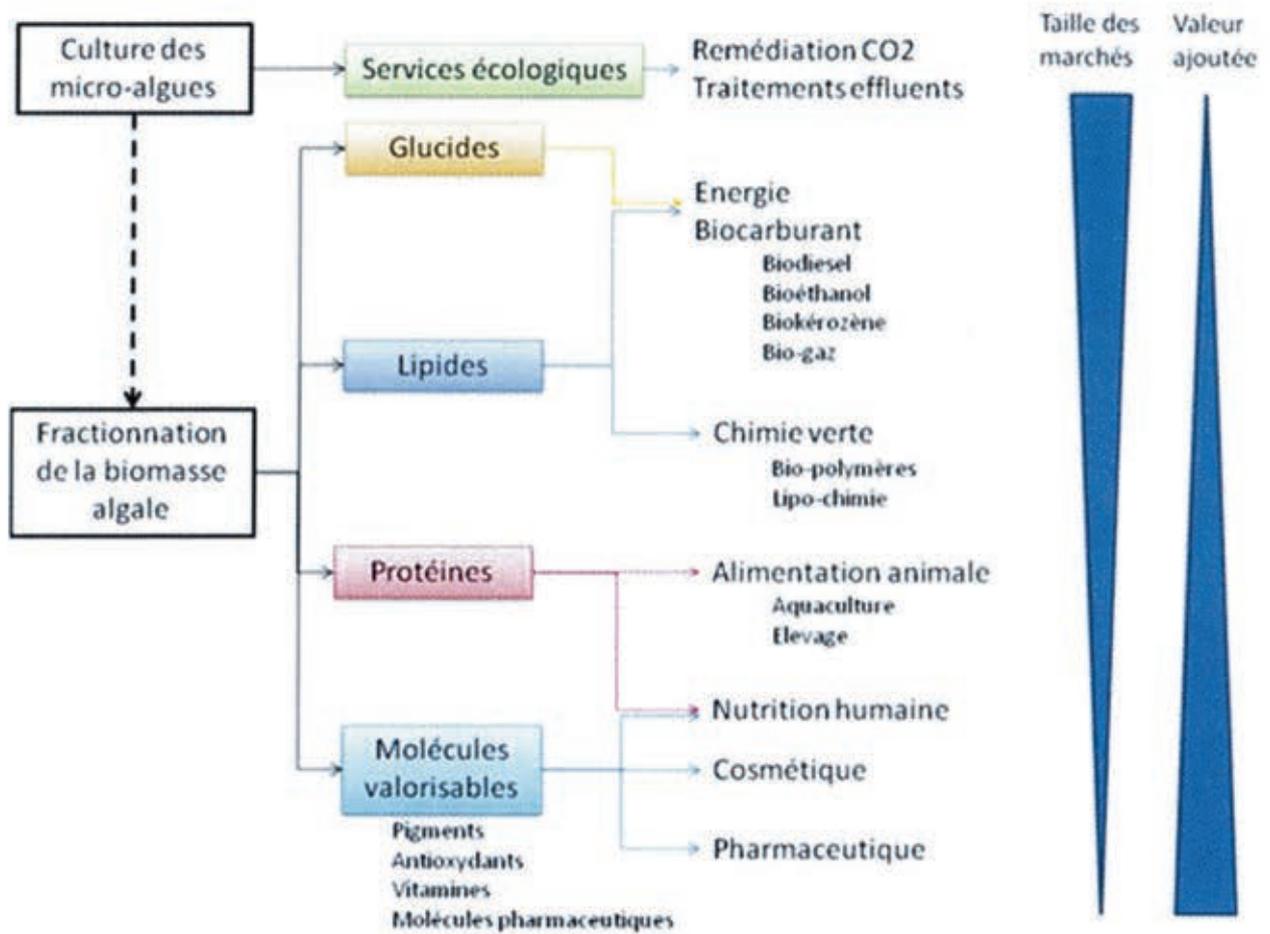
The outlined combination of potential biofuel production, CO₂ fixation, biohydrogen production, and bio-treatment of wastewater underscore the potential applications of microalgae.

Despite its inherent potential as a biofuel resource, many challenges have impeded the development of algal biofuel technology to commercial viability that could allow for sustainable production and utilisation. They include: (1) species selection must balance requirements for biofuel production and extraction of valuable co-products; (2) attaining higher photosynthetic efficiencies through the continued development of production systems; (3) development of techniques for single species cultivation, evaporation reduction, and CO₂ diffusion losses ; (4) potential for negative energy balance after accounting for requirements in water pumping, CO₂ transfer, harvesting and extraction; (5) few commercial plants in operation, therefore, there is a lack of data for large scale plants; (6) incorporating flue gases which are unsuitable in high concentration owing to the presence of poisonous compounds such as NO_x and SO_x.

Sustainability is key to natural resource management or exploitation and it involves operational, environmental and socio-economic considerations; all of which are interdependent. This review outlines the state-of-the-art in biofuel production from microalgae. The uniqueness of the review is in its coverage of the integrated process chain and its interdependencies from algal biomass production, biofuel and co-products recovery processes, and algae-based CO₂ mitigation and wastewater treatment. It identifies the knowledge gaps within each area which can be targeted for focused research and innovation aimed at sustainable development of algae-based biofuel technologies.

Annexe 12. Vue d'ensemble du concept de bioraffinerie pour la filière microalgues

Source : "Algues, filières du futur" Livre turquoise, J. Person, 2010.



Annexe 13. Baccalauréat professionnel spécialité bio-industries de transformations : champ d'activité et extrait de référentiel

Source : Ministère de l'Education Nationale

Arrêté du 1er septembre 2009 portant création du baccalauréat professionnel spécialité "Bio-industries de transformation"

CHAMP D'ACTIVITE

Le titulaire du baccalauréat professionnel bio-industries de transformation (BIT) est un conducteur de ligne dans les industries pharmaceutiques et cosmétiques et alimentaire. Selon le secteur ou la taille de l'entreprise, il peut occuper des emplois de conducteur de production ou de technicien de fabrication.

Le titulaire du baccalauréat professionnel BIT exerce principalement son activité dans les secteurs cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires (compléments alimentaires inclus). Il peut aussi intervenir dans les secteurs émergents tels que les industries de transformation des produits agricoles pour un usage non alimentaire (agri-énergies et agri-matériaux).

Son activité consiste à :

- conduire une ligne de fabrication ou de conditionnement
- réaliser des interventions techniques et de maintenance des équipements de production
- respecter la réglementation et appliquer la stratégie de l'entreprise en matière d'hygiène, de sécurité, de qualité et d'environnement
- organiser le travail et communiquer

Le titulaire d'un baccalauréat professionnel BIT doit donc, dans le cadre de la réglementation, notamment des bonnes pratiques de fabrication, être en mesure de comprendre, d'appliquer et d'expliquer les procédures prescrites.

Encadré suivant les secteurs par un responsable de production ou d'atelier ou d'équipe, il est chargé de réaliser des produits conformes, en respectant les enjeux de productivité, d'hygiène, de qualité et de sécurité des biens, des personnes et de l'environnement.

Le contexte professionnel se caractérise par :

- une exigence accrue en matière de développement durable
- de recours à des technologies avancées.

Le titulaire du diplôme doit être apte à communiquer en un français correct à l'écrit comme à l'oral, en particulier pour la transmission de consignes.

Il peut exercer son activité en travail posté et en horaires décalés.

Process et produits forment un couple indissociable et sont équitablement importants pour le titulaire du diplôme.

Avec l'expérience et/ou le bénéfice de la formation professionnelle continue il peut prétendre à une évolution de carrière vers des postes à responsabilité ou plus grande technicité.

Extrait du référentiel du Baccalauréat professionnel spécialité "Bio-industries de Transformation"

2- Les processus technologiques de fabrication	
CONNAISSANCES	NIVEAU D'EXIGENCE
<p>2.6. Fabrication d'une huile végétale Opérations pouvant être étudiées dans le cadre de cette fabrication : Ionisation - Broyage – Pressage - Extraction par pression et par solvant- Filtration – Décantation – Distillation – Conditionnement</p> <p>IONISATION</p> <p>L'EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE</p> <p><u>Extraction par pression</u></p> <p><u>Extraction par solvant</u></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Donner le principe de l'opération • Donner les domaines d'utilisation • Montrer les conséquences de l'opération sur le produit (composants, microorganismes, insectes,...) <ul style="list-style-type: none"> • Différencier extraction par pression et extraction par solvant • Donner les domaines d'application <p>A partir de schémas fournis, expliquer le principe de fonctionnement des 3 appareils principaux : Presses, hydrauliques, pneumatiques, à vis.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Donner l'influence des différents paramètres sur la qualité d'extraction. <ul style="list-style-type: none"> • A partir de schémas fournis, expliquer le principe de fonctionnement des 3 appareils suivants : cuves de macération, percolateurs, appareils à immersion. • Différencier méthodes à co-courant et à contrecourant, • Donner l'influence des différents paramètres sur la qualité d'extraction.