

Table des matières

1. Introduction :	1
2. Matériel et méthode :	5
3. Résultats :	8
Premiers essais	9
Deuxièmes essais :	10
Troisièmes essais :	11
Quatrièmes essais :	12
Analyse des acides aminés :	13
Analyse Kjeldahl	15
4. Discussion :	15
5. Conclusion :	19
6. Bibliographie	19
Annexe.....	20

1. Introduction :

La production de carburant et de nourriture induit de nombreux effets négatifs sur l'environnement comme la pollution ou la forte émission de gaz à effet de serre. Il faut trouver d'autres alternatives pour se nourrir ou se fournir en énergie pour remédier à ce problème. Une solution serait la production de biocarburants, beaucoup d'études sont faites en particulier sur les algues qui pourraient produire une source de biocarburants ou des compléments alimentaires de bonnes qualités. Une installation faite à partir d'algues est une installation qui consomme peu d'énergie et produit de la nourriture ou du carburant.

Les micro-algues sont des microorganismes capables de se répliquer ou de transférer son matériel génétique, les micro-algues ont la forme d'une algue microscopique, souvent unicellulaire dont le regroupement en colonies peut former des structures visibles à l'œil nu.

Les algues utilisent le procédé de la photosynthèse pour croître, ce qui nécessite de la lumière et du CO_2 . Ce procédé est très important pour la vie sur terre, les algues produisent de l'oxygène en utilisant simultanément le dioxyde de carbone, qui est un gaz à effet de serre, pour améliorer sa croissance autotrophe. Chaque espèce de micro algues a ses propres particularités biochimiques, la composition chimique de ces algues peut varier selon son mode de culture en influençant sur par exemple la température, le pH, la lumière, le CO_2 et les nutriments disponibles.

Les algues peuvent être cultivées toutes l'année sous trois différentes conditions [1] tout d'abord autotrophe, c'est-à-dire qu'elle se développe en utilisant le dioxyde de carbone et l'oxygène de manière autonome grâce à la photosynthèse, les végétaux chlorophylliens sont les plus représentés dans ce domaine. Ensuite, avec une culture hétérotrophe qui est possible pour les algues, elles ne vont pas produire mais consommé les sources de carbones qu'elles ont à disposition dans ces conditions.

Enfin avec la culture en mixotrophie qui est généralement favorisée pour la croissance des microalgues car elle permet d'un côté l'utilisation de la photosynthèse pour produire de l'énergie chimique à partir de l'énergie lumineuse puis la phase du cycle de Calvin qui synthétise la matière organique, le glucose à partir de produits issus de la phase photochimiques et du dioxyde de carbone atmosphérique [2]. Toutes les espèces de micro algues ne sont pas appropriés pour produire des compléments alimentaires ou du biodiesel, certaines manquent de mécanismes d'assimilation appropriés ou ont l'incapacité d'utiliser certaines sources de carbones lorsqu'elles sont coupées de source lumineuse qui stimulerait leur mécanisme d'assimilation. Un excès de lumière peut entraîner une photo inhibition, c'est-à-dire la diminution de la vitesse de la photosynthèse ce qui est nuisible à la croissance [2], le fait d'alterner le jour/nuit comme le fait le mode de culture mixotrophiques permet d'éviter ce problème.

Les micro-algues ont besoin de carbone inorganique pour la photosynthèse, le dioxyde de carbone doit ainsi être solubilisé pour la culture intensive de micro-algues, car l'air ambiant ne contient pas assez de CO_2 . Le CO_2 dissous prend plusieurs formes selon le pH, à un pH neutre le taux de CO_2 et de ions carbonates est presque égal. Le débit du CO_2 doit être régulé avant de pouvoir s'introduire dans le bioréacteur de manière à ne pas faire chuter le pH de la culture, le pH doit être régulé [3].

Il existe plusieurs moyens mis sur le marché pour la culture des micro-algues [4] tels que les photobioréacteurs, ce sont des systèmes ouverts ressemblant à des 'pistes de courses' [figure 1] permettant la culture des algues en plein air avec une illumination naturelle. Ces étangs représentent un certain coût en eau à cause de l'évaporation constante des bassins. Les problèmes de contamination surviennent aussi, il faut favoriser les espèces d'algues pouvant être cultivée dans des pH extrêmes tels que la spiruline par exemple [5]. D'autres parts, les rendements de ces cultures en plein air sont faibles.



Figure 1 Culture de spiruline en plein air

Les systèmes fermés existent et sont conçus pour obtenir une productivité maximale. Ils existent les photobioréacteurs cylindriques [figure 2], plan ou "plastic bag". Tous ont comme principe d'obtenir le meilleur éclairage pour favoriser la photosynthèse. L'apport en CO est plus facile tout comme l'évacuation de l'oxygène y est facilitée car si l'oxygène s'accumule cela peut représenter un problème pour la croissance des microalgues [6].

CULTURE DE MICRO-ALGUES A L'ECHELLE INDUSTRIELLE



Figure 2 Culture en bioréacteur 'plan'

La microalgue utilisée dans ce travail est l'espèce de *Chlorella vulgaris* de la famille des *Chlorellaceae*. Cette espèce a des propriétés proches de la spiruline dans ses utilisations. Elle a une forte concentration de chlorophylles ce qui lui permet une bonne photosynthèse. La *Chlorella vulgaris* est déjà utilisée au Japon et en Europe comme complément alimentaire. Plus de 2000 tonnes de différentes espèces de *Chlorella* ont été produites en 2009 principalement en Allemagne, à Taiwan et au Japon [2]. Ces espèces sont

principalement utilisé pour compléter l'alimentation humaine ou animale [7] ou pour fabriquer du biodiesel.

L'objectif de ce travail est d'optimiser la croissance de l'algue verte *Chlorella vulgaris*. Les paramètres à varier lors de ce projet est la quantité de mélasse et la quantité d'acétate ajoutée au milieu de culture. Un apport de CO₂ constant aux différents échantillons sera fait afin de stimuler la croissance en ajoutant cette source de carbone inorganique supplémentaire. Les algues sont cultivées dans le noir de manière hétérotrophes et à température ambiante afin de réduire au maximum le bilan énergétique de la production de ces algues.

Conditions et paramètres du mode de culture :

1.1 Mélasse :

L'utilisation de la mélasse comme souche de carbone est un produit idéal car peu coûteux et très riche en sucre. Les sucres présents généralement dans la mélasse sont le sucrose à environ 25%, le glucose à 25% et le fructose à 25% aussi. Si la mélasse utilisée ne doit pas contenir une majorité de saccharose ou sucrose car le sucre est un disaccharide nécessitant l'enzyme invertase qui peut hydrolyser le saccharose en glucose et fructose que les algues n'ont pas. Le sucrose est peu assimilable pour les organismes végétaux au vu de sa complexité.

1.2 Acétate de sodium

L'utilisation de mélasse en combinaison avec de l'acétate de sodium n'a pas encore été étudié sur une culture de *Chlorella Vulgaris*, la croissance d'une souche de *Neochloris oleoabundans* a été étudié avec comme source de carbone la combinaison de mélasse et d'acétate de sodium et montre des résultats prometteurs [8]. L'étude va se comporter sur l'utilisation de la combinaison de ces deux sources de carbones et avec un apport constant de CO₂.

1.3 Conditions d'hétérotrophies

Dans la mesure du possible, la croissance hétérotrophe surmonte les limitations majeures de la production de produits utiles à partir des microalgues dépendante à la lumière. Ces algues dépendantes de l'apport lumineux compliquent considérablement le processus, augmente les coûts et réduit la production de produits potentiellement utiles. En règle générale, et dans la plupart des cas, la culture hétérotrophe beaucoup moins cher, plus simple à construire, et plus facile que la culture autotrophe à maintenir à grande échelle. Cette capacité permet l'extension d'applications utiles de diverses espèces d'algues qui sont maintenant très limitées en raison des coûts élevés de l'autotrophie [9]

Par conséquent, l'exploitation des microalgues est limitée à un petit volume mais c'est une grande valeur qu'il faut utiliser.

Les conditions de culture de manière hétérotrophes dans le noir, sont pour minimiser les coûts que représenterait une culture de microalgues. La culture en conditions hétérotrophes à quelques désavantages, elle accroît le risque de contamination bactériologique, réduit la croissance si aucune source de carbone n'est ajoutée au mélange, la production de pigments est inhibée et pas toutes les espèces d'algues permettent la croissance en conditions hétérotrophes.

Uniquement la phase sombre de la photosynthèse est utilisée par les algues car elles n'ont pas accès à la lumière, au cycle de la photosynthèse. Le cycle de Calvin est utilisé par les algues durant la phase sombre, il permet le captage du CO₂, la réduction puis la production de glucose. [Figure 3]

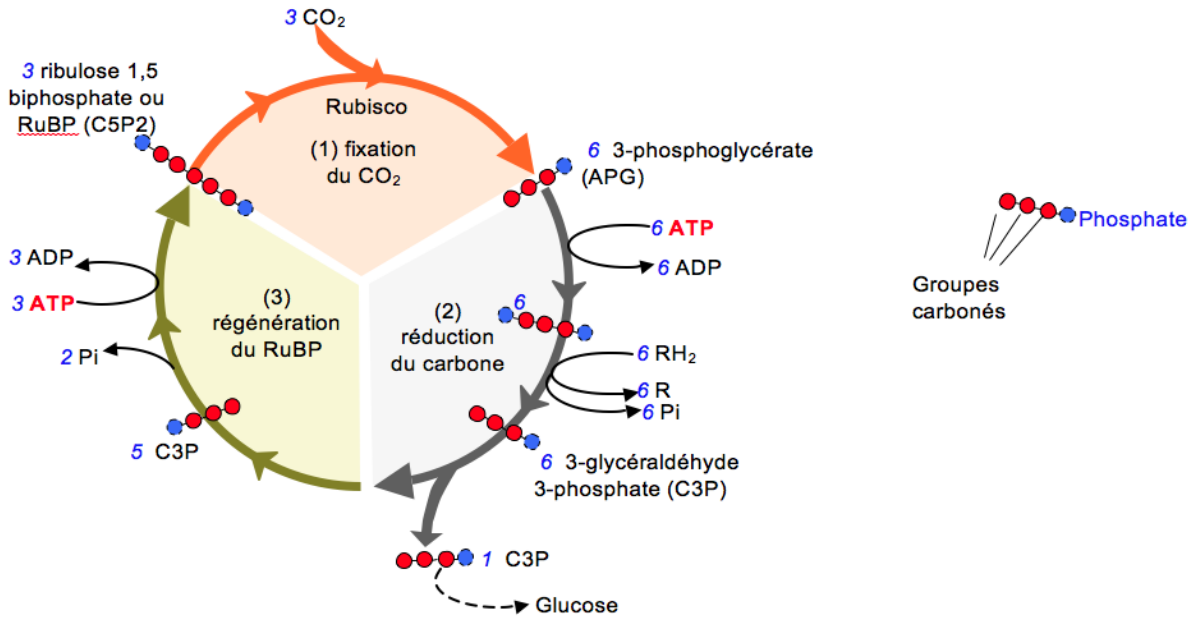


Figure 3 Cycle de Calvin

Cette phase va réduire le CO₂ en matières organiques (lipides, glucides et protéines). Cette phase est normalement dépendante des produits créés lors de la phase éclairée mais ne dépend pas directement de l'énergie lumineuse. Cette phase a besoin d'un apport continu en ribulose 1-5, diphosphate, mais heureusement cette molécule est régénérée lors du cycle de Calvin. Pour une molécule de CO₂ fixée, trois molécules d'ATP et deux molécules de NADH sont consommées.

1.4 Respiration cellulaire

Même lorsqu'il n'y a plus de source lumineuse, les microalgues continuent de produire de l'ATP et du NADPH par respiration mitochondriale ou respiration cellulaire. Cette respiration a lieu dans les mitochondries et son fonctionnement est basé sur le transfert d'électrons [figure 4] comme la photosynthèse.

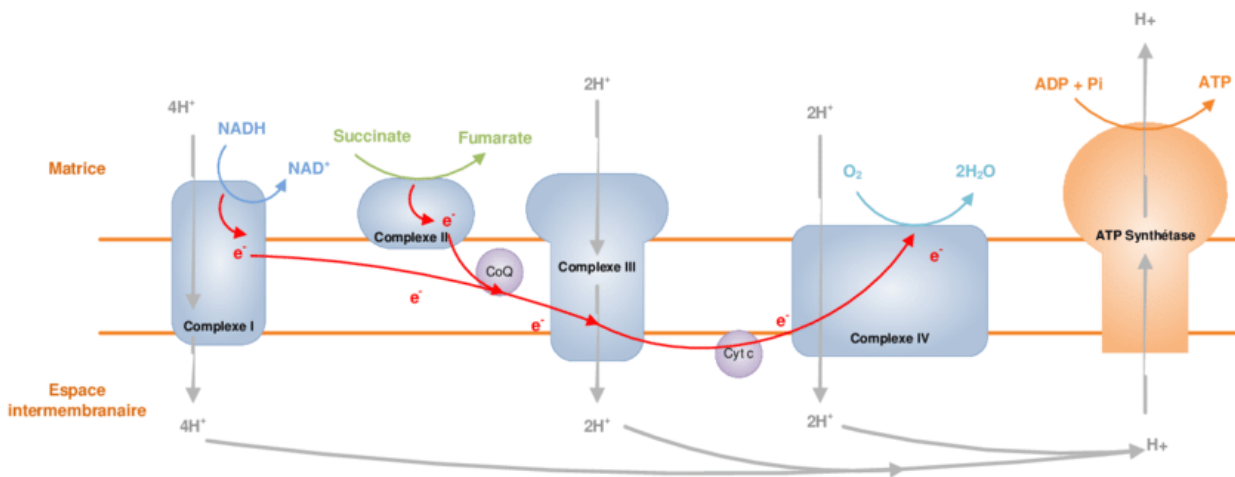


Figure 4 Respiration cellulaire au sein de la mitochondrie

Il s'agit de quatre complexes enzymatiques, se trouvant dans la mitochondrie. Ces complexes vont transporter les électrons jusqu'à la transformation d'oxygène en eau. Ces complexes créent aussi un complexe de protons, ce gradient de protons permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase. La respiration cellulaire permet la consommation d'oxygène et la formation d'ATP.

La production de biomasse en phase d'hétérotrophie est limitée [10], il faut s'attendre à de moins bons

rendement qu'une culture en mixotrophie.

1.5 Le milieu de culture BBM 3N

C'est le milieu généralement choisi pour optimiser la croissance de *Chlorella Vulgaris* à la lumière [11]. Il permet à la souche de *Chlorella Vulgaris* de se comporter en photolithotrophe carbone autotrophe [12], la lumière est la source primaire d'énergie permettant de régénérer le NADPH et l'eau.

Le carbone tire sa source principalement du CO₂/carbonates, la souche fixe le dioxyde de carbone, elle cultive en autotrophie. L'azote est assimilé sous forme minérale de NO₃⁻, le soufre est présent sous forme minérale de SO₄²⁻ qui est assimilables. Les macro et micronutriments minéraux sont apportés en traces contrôlés par le milieu. L'EDTA permet de complexer l'apport en cation magnésium.

2. Matériel et méthode :

Afin de réaliser ce travail, divers appareils et matières premières ont été utilisés. Ceux-ci sont répertoriés dans la partie « matériel ». La partie « méthode » contient les différentes procédures utilisées pour réaliser ce travail.

2.1 Matériel

Le tableau suivant récapitule les différents appareils utilisés lors de ce travail.

Tableau 1 Appareils utilisés

Appareils	Référence	N° lot
Lampe à spectre complet	EXO TERRA, reptil glo 2.0/T8	PT-2150
Bouteille de Gaz CO2	Pangas	204-596-9
AutoKjeldahl Unit	Büchi, K-370	
KjelDigesteur	Büchi, K-449, Scrubber B-414	
Autoclave	Vitaris, Technoclav 50	NF 291
Spectrophotomètre	Biochrom, libra S12	80-2115-10
Thermomètre	Testo 925	
pH-mètre	Metrohm 913	
Centrifugeuse Universal 320	Hettich	
Étuve Memmert	Singledisplay	
Balance de précision ±0.0001g	Adventure Pro, OHAUS	

Le tableau suivant liste les différents ustensiles utilisés ainsi que les réactifs pour la préparation des milieux.

Tableau 2 Réactifs utilisés

Réactifs	Référence	N° lot
NaNO ₃	Fluka	1300431
K ₂ HPO ₄	Acros Organics	A0381546
NaCl	PanReac AppliChem	0001087112
KH ₂ PO ₄	Acros Organics	A0375741
MgSO ₄ x 3H ₂ O	Acros Organics	A0330947
CaCl ₂	Fluka	BCBC5457V
FeSO ₄ x 7H ₂ O	Merck	A0019563 847
KOH	Cochimy	61710537
EDTA	Sigma	SLBM2279V
CuSO ₄ x 5 H ₂ O		
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	Fluka	14005142
MnCl ₂	Acros Organics	A0347558
CoCl ₂ x 6H ₂ O	Fluka	35742971 896
NaMo x 2H ₂ O	Fluka	10404273
HBO ₃	Sigma	078K0037
Vacuum-driven Filters	BPE2250 / BPE2210	
Mélasse	Apfelford's Bio	1070C
Sodium Acétate	2462784	Labo F206
L-Tryptophan 99%	Acros organics	A0393701
Kjeldahl Tablets	Titanium	11057980
NaOH 0,1 M	Udt 18.04.19	
CO ₂	Pangas	204-696-9
Sulfuric acid 95%	Acros Organics	A0387907
Sulfuric acid 0.25Mol/L	Mmi	5.12.18

La composition de la mélasse pour 100g est de 72,6g de glucide, 1.4g de fibres alimentaires, 1.1g de protides, 0.5g de sel, 808mg de phosphore, 33mg de fer 280 mg de magnésium et 487mg de potassium.

2.2 Méthode :

La souche utilisée pour l'ensemencement de mes erlenmeyers provenait d'un échantillon venant de Munich qui fut étalé sur une plaque de 3N BBM afin d'observer la croissance et d'en isolé les colonies d'algues. Les algues ont poussée sur la plaque en conditions mixotrophies à température ambiante, une contamination de colonies blanches était présente sur la plaque de départ c'est pourquoi il a fallu refaire une plaque avec uniquement le prélèvement des colonies d'algues.

Un milieu de culture de 3N BBM fut préparé et 0,45% de mélasse a été ajoutés afin de favoriser d'autant plus la croissance des microalgues en condition mixotrophiques [13]. Quelques colonies de Chlorella vulgaris furent inoculée dans un erlenmeyer de 300ml préalablement stérilisé.

La culture souches est resté sous agitation sous une lampe avec un ratio de lumière/noir de 16h/8h afin de favoriser un maximum sa croissance [14] l'agitation est importante afin que toutes les algues aient accès à la lumière et ne subissent pas d'entassement au fond de l'erlenmeyers cachant ainsi l'accès à la lumière de la plupart des cellules.

Après 6 jours de croissance, les essais ont pu débuter, des prises correspondant à 20% (v/v) du volume

total de 3N BBM ont été prélevées dans la culture souche afin d'ensemencés les six erlenmeyers des premiers essais préalablement stérilisés [figure 5].

Une fois que le volume pour les essais était prélevé, il a fallu compléter avec du BBM 3N l'erlenmeyer contenant la culture souche jusqu'à un volume d'environ 300ml afin de laisser se multiplier les algues en milieu mixotrophiques pour les futurs essais.



Figure 5 Déroulement de la croissance en hétérotrophie

Les essais étaient réalisés en culture statique, ce qui limite l'accès au CO₂ à une certaine partie des molécules d'algues et ce qui n'est pas idéale pour obtenir de bons rendements, mais dans notre cas le rendement n'est pas important c'est les l'influence des différents paramètres qui est étudié.

Tous les 2 jours la croissance des échantillons est contrôlée avec une mesure du pH, de l'absorbance à 560nm et de la température. L'alimentation en CO₂ varie légèrement entre les prises d'échantillons car il est difficile d'obtenir un débit régulier pour tous les erlenmeyers, il faut également mesurer le débit et l'ajuster tous les deux jours.

Après une durée de 10 jours de culture, les échantillons sont vidés dans des tubes Falcon® de 50ml, le volume de culture est déterminé, puis les échantillons sont centrifugés à 9000rpm pendant 10 min, le liquide purifié d'algues est éliminé puis les algues sont ensuite lavées 3x avec 10ml d'eau déminéralisé afin de purifier les algues des minéraux restants. Les algues sont ensuite séchées dans les tubes Falcon dans une étuve à 60°C pendant 16h. Les algues sèches peuvent ainsi être récupérées et analysées.

Les algues sont ensuite prélevées et pesées au dixième de mg. La quantité de matières connue et le volume de bouillon récupérés et mis en relations pour déterminer le rendement en gramme par litre selon l'équation 1 :

$$\text{Rendement} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\text{masse d'algues (g)}}{\text{Volume de culture (L)}}$$

Équation 1 Rendement biomasse

Le rendement correspond à la biomasse sèche produite

Détermination du taux de protéines :

La quantité de protéine présente dans les algues a été déterminée avec la méthode de Kjeldahl. Des prises de 150mg d'algues sèches ont été prélevées pour ces analyses.

La quantité de protéine pour 100g d'algues a été obtenue avec cette équation :

$$\text{Taux de protéines} \left(\frac{g}{100g} \right) = \frac{V_{\text{titrant}} - V_{\text{blanc}} * \text{Conc H}_2\text{SO}_4 * M_m N * \text{Facteur}}{\text{Masse de l'échantillon}} * 100$$

Équation 2 Pourcentage de protéines

Remarque :

Durant l'analyse Kjeldahl, la minéralisation ne s'est pas faite correctement car le tube servant à évacuer les vapeurs d'acide sulfurique était rempli d'eau, l'analyse a dû être stoppée puis relancée, une fois le tube vidé et séché. Il se peut que les échantillons aient réagi différemment par suite de ce désarroi. Les standards pourront affirmer cette hypothèse s'il n'arrive pas correctement à la valeur cible.

Détermination du taux d'acides aminés :

L'identification des différents acides aminés ainsi que la teneur en acides aminés a été réalisée par le département de chimie et de biochimie de l'université de Berne. La méthode quantitative utilisée était l'hydrolyse en UV/Visible, la longueur d'onde était de 247nm, la colonne utilisée était une Repropack C18, 3.9*150mm et 4 µg de microalgues sèches ont été utilisées par analyse.

Le taux d'acides aminés essentiels présent dans chacun des essais a été déterminé avec ce calcul :

$$\text{Taux d'AA essentielle} = \frac{\text{Somme des acides aminés essentiels}}{\text{Somme total des AA présent}} * 100$$

Équation 3 Taux d'acides aminés essentiels

Plan d'expérience :

Les premiers essais ont été faits dans des erlenmeyers de 300ml. Les premiers essais variaient le taux de glucose et le taux de sodium acétate de la manière tout en ajoutant de manière constante et pareille pour chaque erlenmeyer, bulle par bulle, du CO₂. Il faut d'abord observer si la croissance se fait avec ces trois sources de carbones.

L'essai qui aura la meilleure production de biomasse ainsi qu'une meilleure absorbance sera choisi comme modèle pour les essais suivants.

Les deuxièmes essais seront sur l'optimisation du taux d'acétate en fonction du taux de mélasse optimale issu des premiers essais.

Les troisièmes essais nous renseigneront sur la répétabilité et la reproductibilité des mêmes essais mais sur des volumes plus gros soit 1 litre.

Les quatrièmes essais seront pour la reproductibilité des essais ainsi que la confirmation des hypothèses imaginées au cours des essais précédents.

3. Résultats :

Tout d'abord, il faut préciser que les algues sont une matière vivante, les réactions ne sont pas forcément

les mêmes entre les différentes souches. Tous les résultats n'ont pas pu être effectués en triplicata, par manque de temps et de matériel, il faut donc prendre les résultats avec une certaine prudence.

Premiers essais

Le graphique montre les premiers essais de croissance de *Ch. Vulgaris* avec comme ajout du CO₂, de l'acétate et de la mélasse.

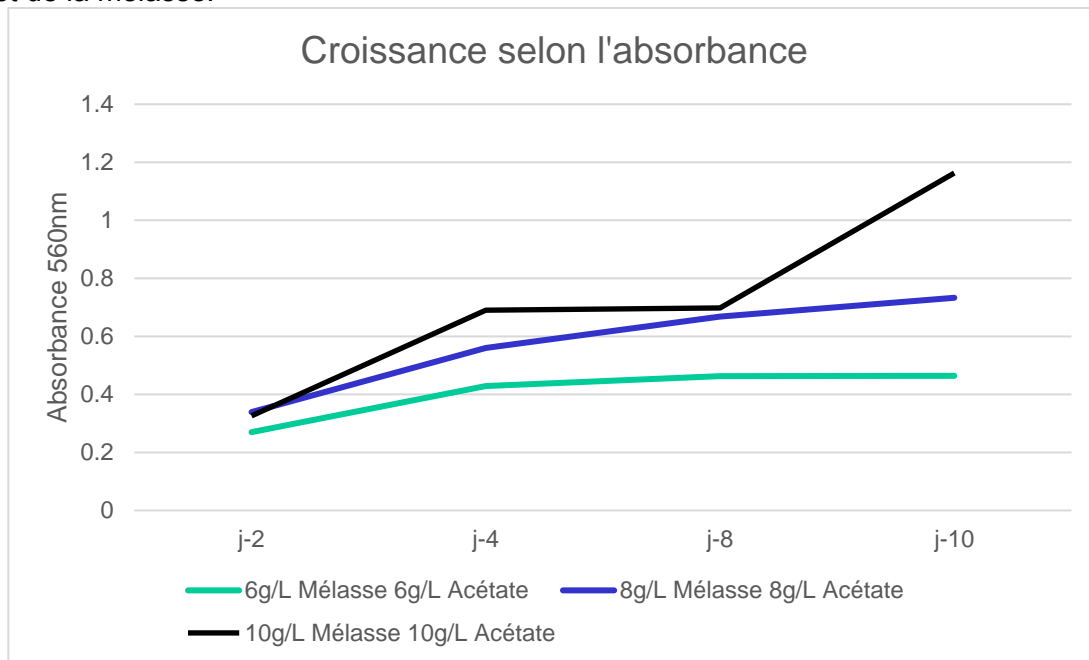


Figure 6 mélasse/acétate

La tendance montre qu'au fil des jours la croissance continue, l'échantillon avec la plus forte croissance est celui de l'échantillon contenant 10g/L de mélasse et 10g/L d'acétate de sodium.

Les résultats de la croissance s'expriment aussi avec la quantité de biomasse produite à la fin des 10 jours. La quantité récupérée est exprimée en gramme par litre dans ce graphique.

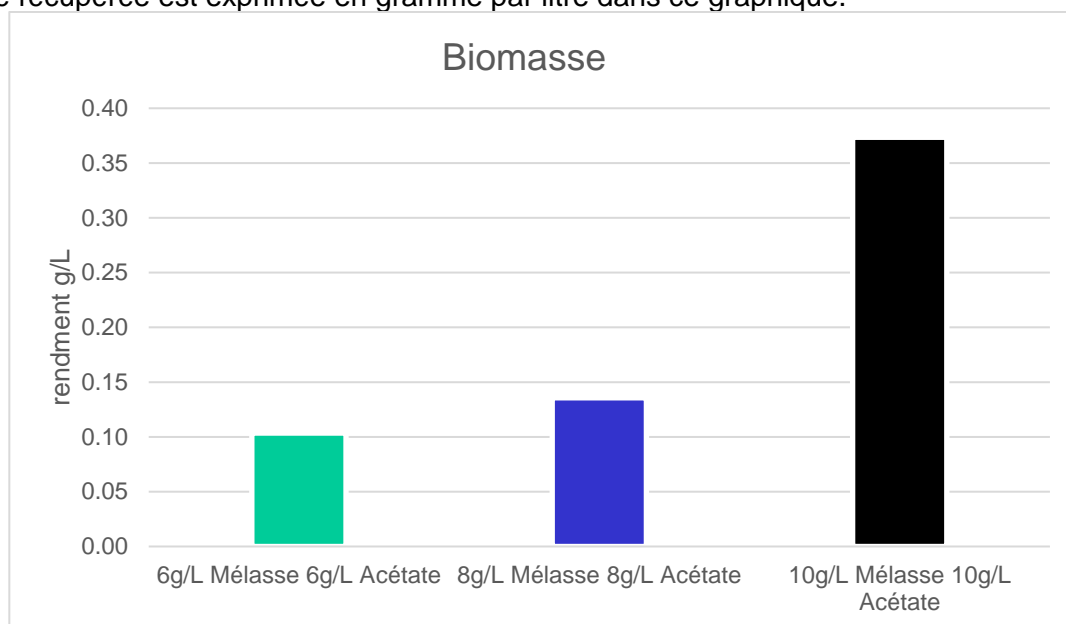


Figure 7 Rendement mélasse/acétate

Les rendements concordent avec les courbes d'absorbance, le rendement maximal obtenu est de 0,37g/L avec l'échantillon contenant les 10g/L de mélasse et d'acétate de sodium.

Deuxièmes essais :

Les deuxièmes essais ont fait varier le taux d'acétate de sodium avec toujours la même quantité de mélasse dans le milieu. Les courbes d'absorbances sont plus discutables que lors des premiers essais.

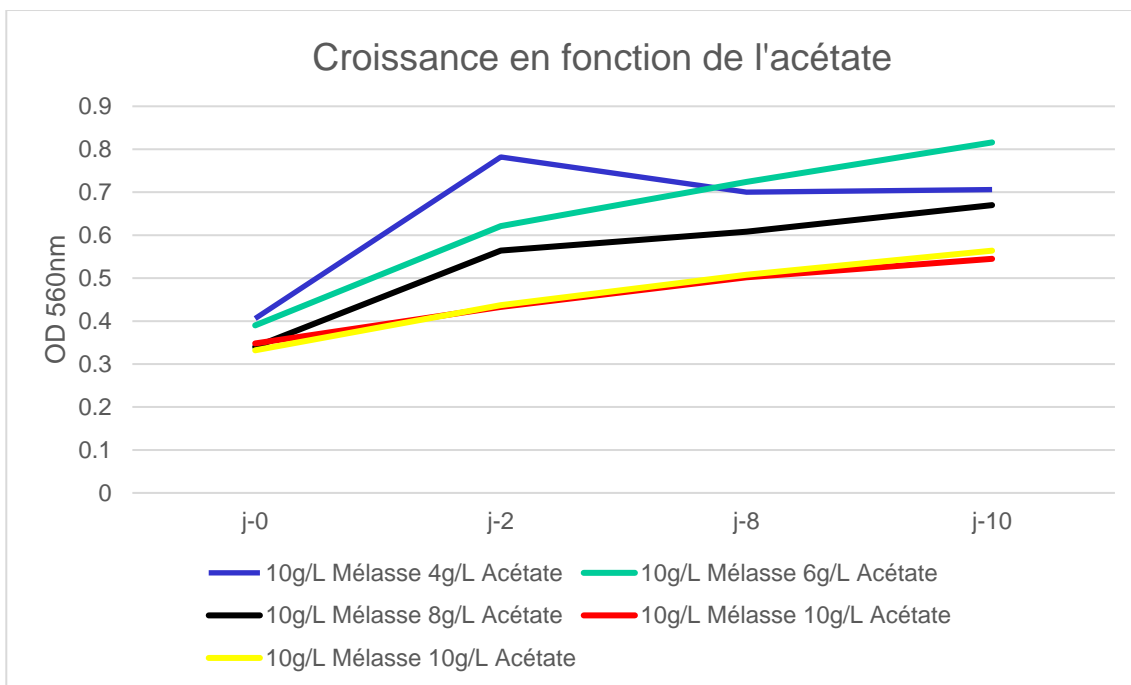


Figure 8 croissance de l'optimisation du taux acétate

L'échantillon sortant avec l'absorbance la plus élevée étant l'échantillon avec 6g/L d'acétate de sodium et les deux échantillons correspondant à l'essai ayant le meilleur rendement lors des premiers essais, soit l'échantillon contenant 10g/L de mélasse et d'acétate de sodium, montrent les absorbances les plus faibles.

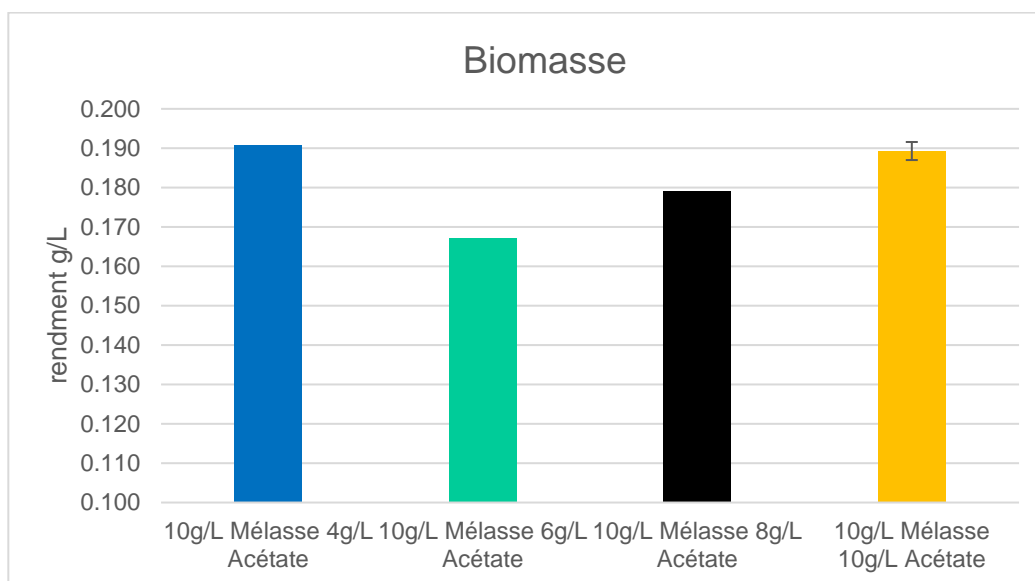


Figure 9 rendement de l'optimisation du taux acétate

Les rendements obtenus ne correspondent pas aux courbes d'absorbance, l'échantillon obtenant le meilleur rendement qui est de 19,1g/L est celui qui était dans le milieu contenant 4g/L d'acétate de sodium et 10g/L de mélasse. L'échantillon qui avait la plus grande absorbance se retrouve avec le plus bas rendement soit 16,7g/L

Troisièmes essais :

Les troisièmes essais ont consisté à valider la répétabilité des essais ainsi que de tester si une croissance était possible sans ajout de CO₂ tout au long des 10 jours de cultures seulement avec 10g/L de mélasse. L'impact de l'acétate de sodium a permis d'être étudiée avec ces essais.

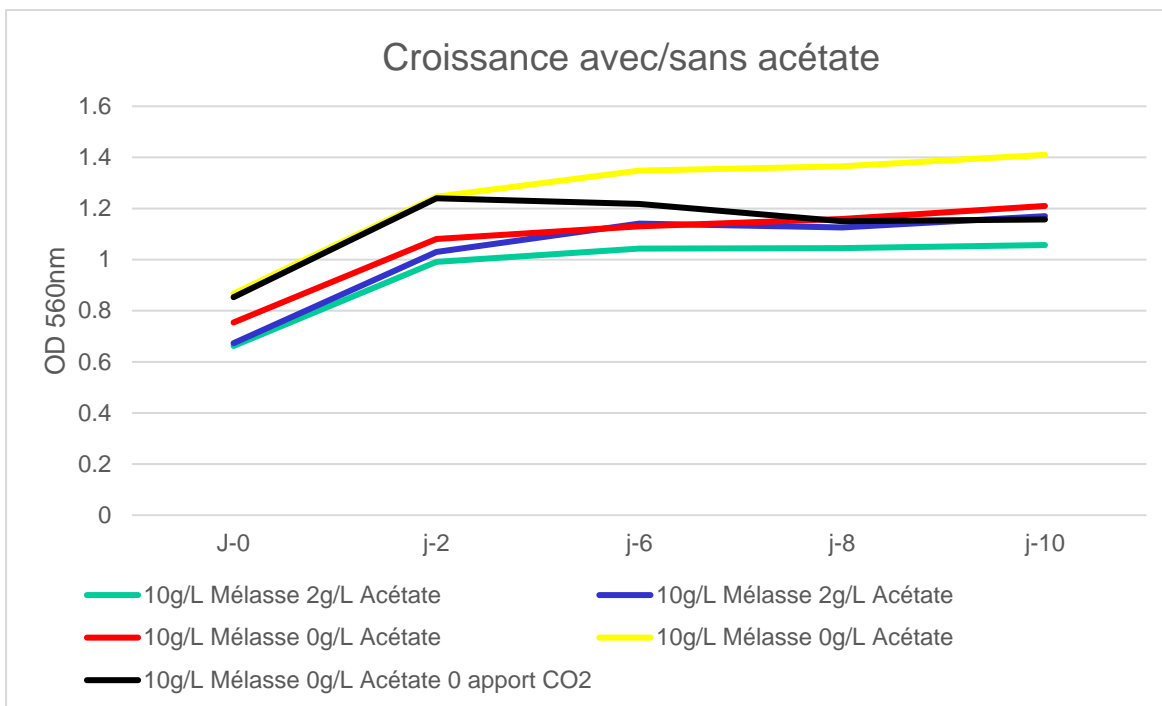


Figure 10 courbes d'absorbance avec/sans acétate

On remarque une meilleure absorbance pour les échantillons sans acétate de sodium ainsi qu'une légère décroissance de l'échantillon sans CO₂ au bout du deuxième jours.

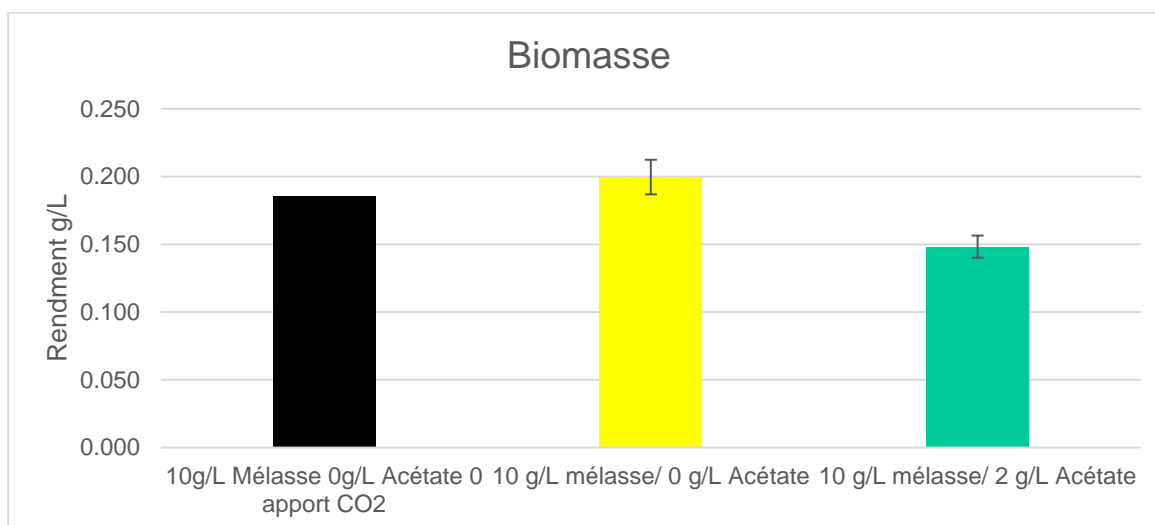


Figure 11 Rendement avec/sans acétate

Le rendement correspond avec les absorbance observées, l'échantillon sans CO₂ montre une meilleure croissance que l'échantillon ayant 2g/L d'acétate de sodium. Les essais montrant la meilleure croissance étant ceux avec 10g/L de mélasse et 0g/L d'acétate de sodium, le rendement est de 0.20±0.01g/L

Les courbes d'évolution du pH au fil des jours est intéressante à regarder pour ces essais car il permet de voir l'effet du CO₂ ainsi que de l'acétate.

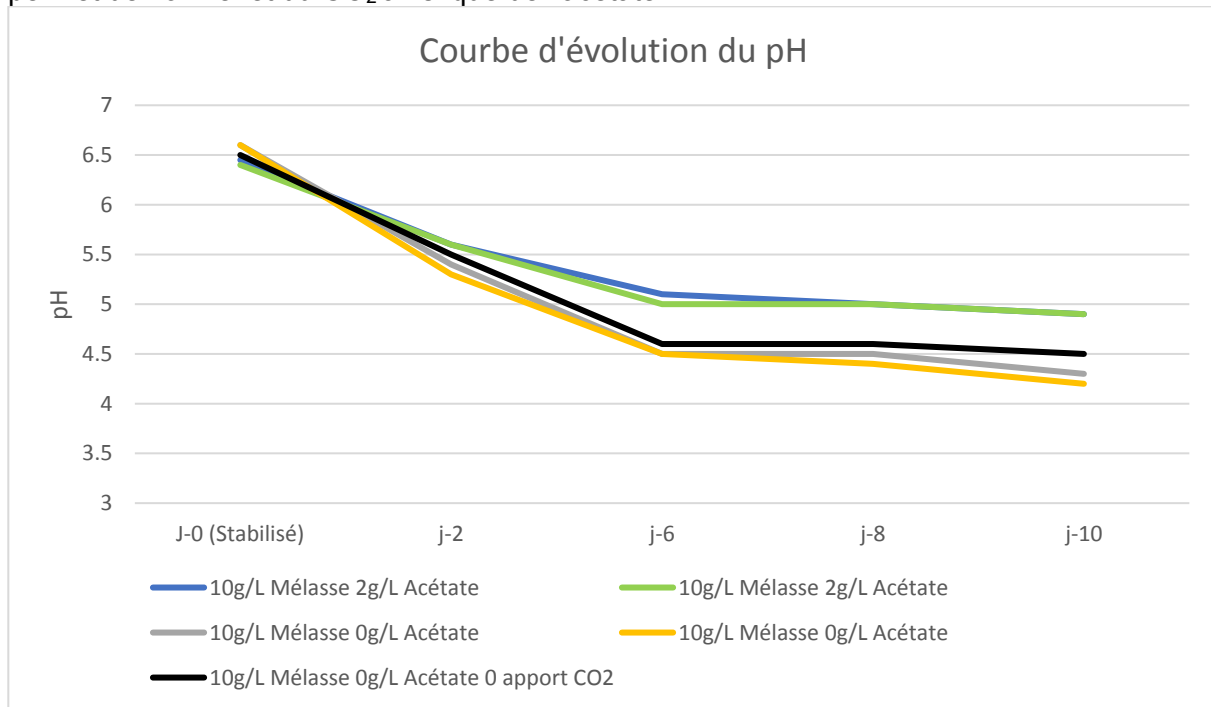


Figure 12 pH en fonction des jours

Le graphique nous montre l'effet tampon de l'acétate de sodium, les échantillons n'ayant aucun ajout d'acétate descende jusqu'à un pH inférieur à 4,5. L'échantillon sans CO₂ ne descende pas en dessous de 4,5 et se stabilise.

Quatrièmes essais :

Les quatrièmes essais furent pour confirmer la légère inhibition de la croissance des algues dû à l'acétate de sodium. Les essais ont été fait sur un volume de 1 litres afin de pouvoir envisager la possibilité d'un changement d'échelle de production pour le futur.

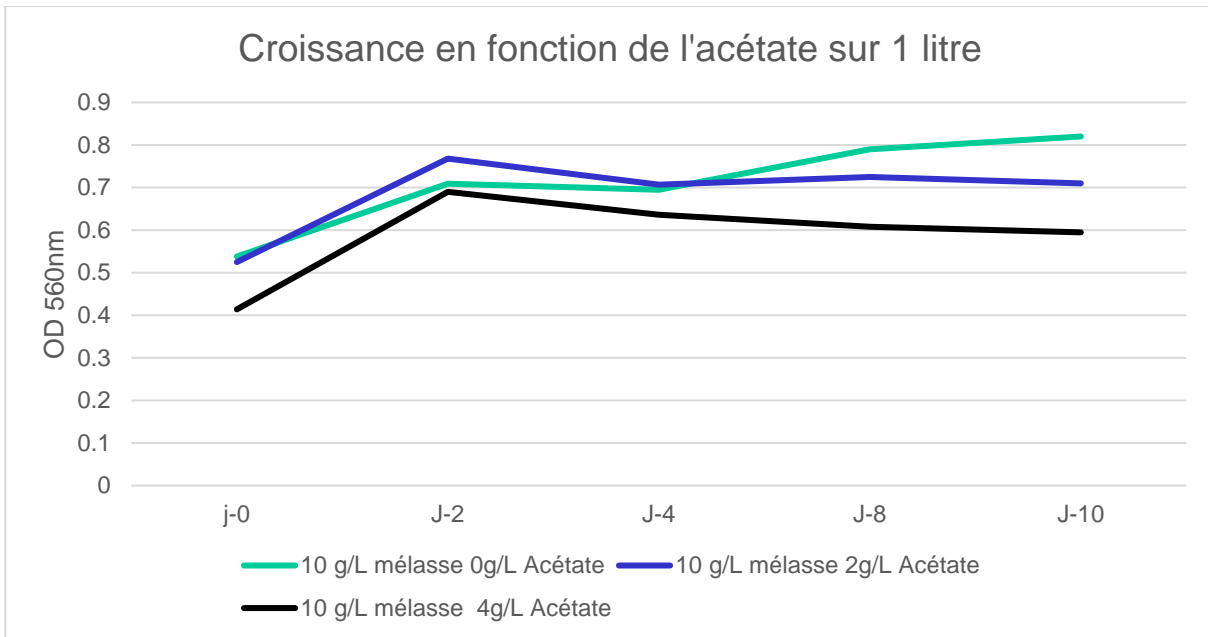


Figure 13 Croissance dans 1 litres en fonction de l'acétate

Les courbes d'absorbance confirment l'hypothèse que l'acétate de sodium inhibe la croissance de *Chlorella Vulgaris*.

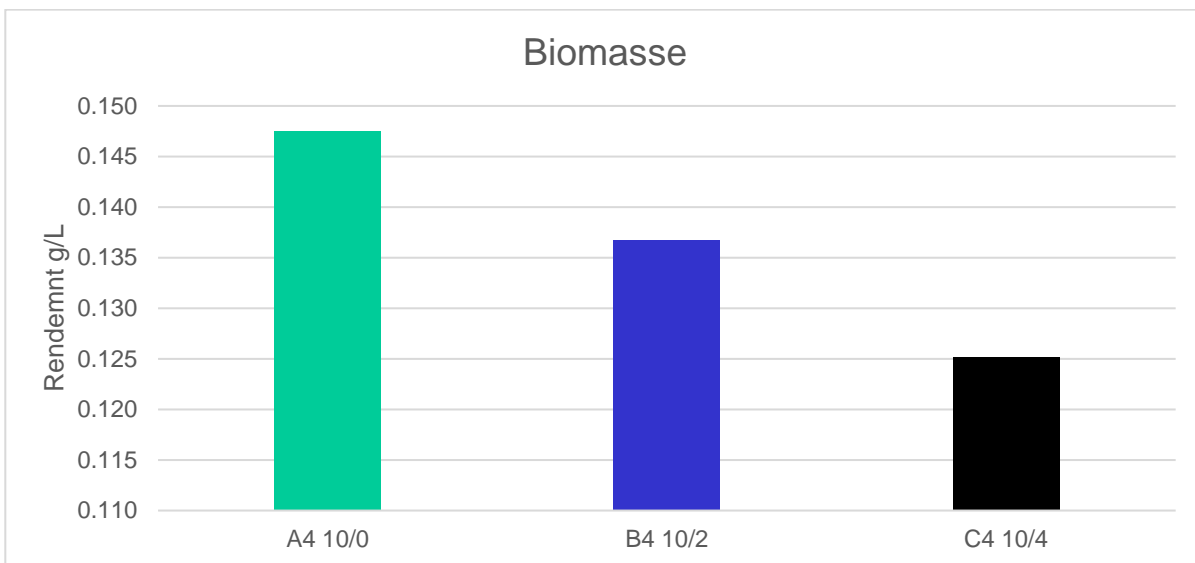


Figure 14 Rendements pour 1 litre en fonction de l'acétate

Les rendements obtenus sont identiques aux courbes d'absorbance observées, le meilleur rendement étant obtenu avec 10g/L de mélasse. Ces résultats confirment l'hypothèse faite sur l'acétate de sodium et permettent aussi d'observer que la croissance se produit même avec de gros volume.

Analyse des acides aminés :

Les acides aminés ont été analysés afin d'obtenir un comparatif entre les paramètres variant et le taux d'acides aminés retrouvés ainsi que la proportion d'acides aminés essentielles.

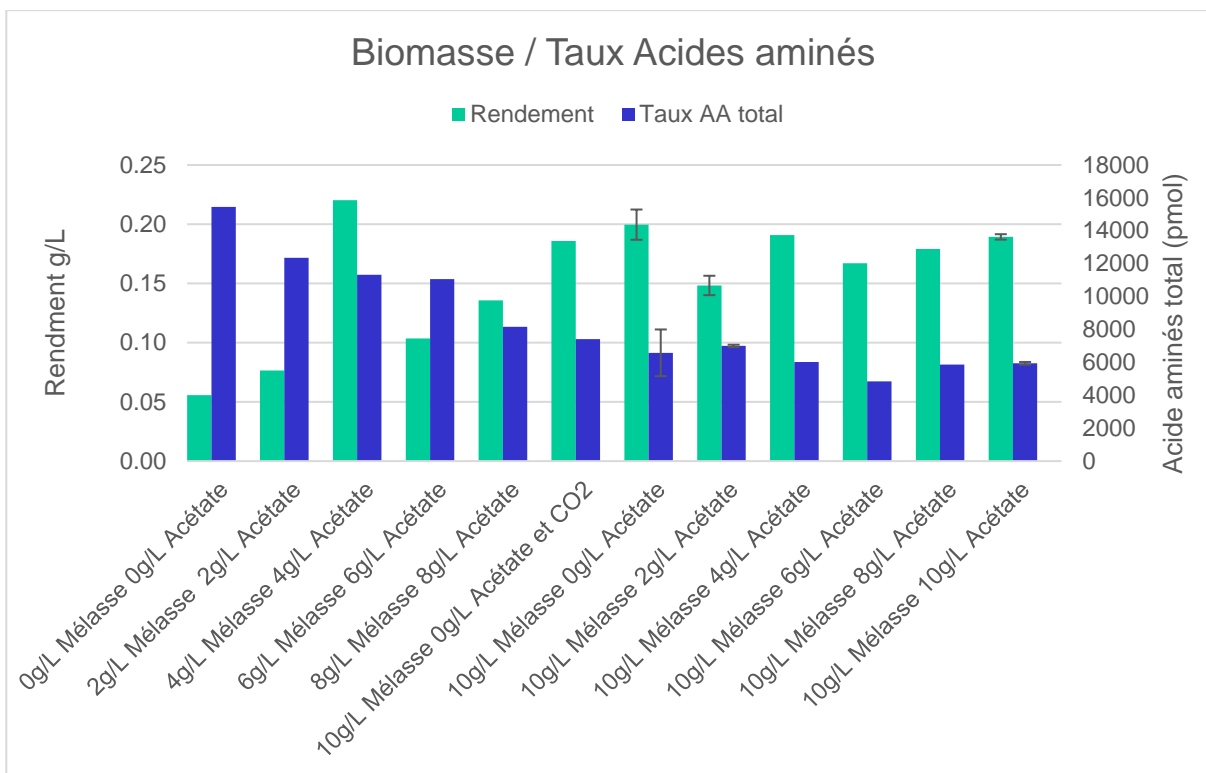


Figure 15 Comparaison rendement/acides aminés

Le graphique montre une nette augmentation du taux total d'acides aminés lorsque les milieux sont peu ou pas modifiés par l'ajout de la mélasse ou de l'acétate de sodium.

Le taux maximal d'acides aminés obtenu est de 15452 pmol pour 4 μ g d'algues.

Les 8 acides aminés essentiels présents dans les algues tels que l'histidine, la thréonine, la valine, l'isoleucine, la méthionine, la leucine, la phénylalanine et la lysine ont été quantifiés et montrent une proportion presque égale parmi toutes les analyses avec comme résultats un pourcentage de $40,1 \pm 0,01\%$ d'acides aminés essentiels. Le taux d'acides aminés total varie en fonction des paramètres mais n'a aucun impact sur la composition biochimique de la souche d'algues.

Les acides aminés captant l'acétate ont été identifiés comme glutamate, proline, arginine et leucine [15] dans les algues bleu-vertes. On peut observer si les essais contenant de l'acétate de sodium obtiennent une augmentation du taux de ces différents acides aminés.

Tableau 3 Comparaison avec/sans acétate sur acide aminés ciblé

Acides Aminés	Essais avec 10g/L mélasse et 0g/L acétate	Essais avec 10g/L mélasse et 2g/L acétate
Glutamate	783,9	840,9
Arginine	214,2	226,6
Proline	317,6	337,7
Leucine	534,9	563,3

On remarque une tendance d'augmentation du taux d'acides aminés dans l'échantillon contenant l'acétate, l'acétate a bien été capté par ces acides aminés.

Analyse Kjeldahl

Deux échantillons ont pu être analysés avec la méthode Kjeldahl

Tableau 4 Résultats taux de protéines

Essais (Volume = 1 litre)	Résultats (%protéine pour 100g)	Écart-type	CV
10g/L mélasse et 2g/L Acétate de sodium	26,4	1,8	6,8
10g/L mélasse et 10g/L Acétate de sodium	18.1	-	-

La tendance remarquée est une diminution du taux de protéine lorsque l'acétate de sodium est en plus forte concentrations dans le milieu.

4. Discussion :

Il faut rappeler tout d'abord, que les résultats sont à prendre avec précaution car les conditions d'analyses n'étaient pas optimales et les résultats ne sont pas vraiment reproductible car la souche de base évolue au fil des jours tout comme les essais.

Discussion générale :

Les résultats montrent une croissance possible de *Chlorella vulgaris* dans le noir avec comme source de carbone uniquement mélasse et CO₂. Les essais avec l'acétate de sodium ont démontré que cette source de carbone n'était pas optimale pour ce type de croissance. Les rendements varient de 0,10 à 0.37g/L. La valeur de 0,37g/L n'a pas pu être égalée par la suite, car l'essai provenaient de la première inoculation de souches de *Chlorella vulgaris*, soit des souches fraîches qui avaient toutes les conditions nécessaires pour se multiplier, ce qui par la suite c'est amoindri sûrement dû au manque de mélasse mis à disposition dans la culture de base.

Les courbes d'absorbance coïncident de manière logique avec le rendement sauf pour quelques échantillons de la figure 8 et 9. L'échantillon contenant 4g/L d'acétate de sodium obtient la meilleure absorbance mais le moins bon rendement, le problème de la prise d'échantillon lors de la détermination de l'absorbance n'est pas envisageable car les deux échantillons contenant 10g/L de mélasse et d'acétate sont très répétable à ce niveau. Le problème vient probablement lors du pesage des échantillons, beaucoup de matière a pu rester collée aux parois des tubes Falcon® et devenir irrécupérable avec une spatule pour la pesée.

Les meilleures croissances étant obtenue avec 10g/L de mélasse dans le milieu. Les rendements entre les essais de 1000ml [figure 13] baissent d'environ 20% par rapport à ceux de 300ml [figure 11], cela est peut-être du au CO₂ qui a plus de mal d'être distribuée au sein de toutes les algues dans une culture statique. Les cellules d'algues au bout de quelque semaines n'était plus vraiment de la même 'fraicheur' pour croître dans ces conditions.

La comparaison entre les rendements et le taux d'acides aminés total fait remarquer que lorsque le milieu est stimulé par une source de carbone tels que la mélasse le taux d'acides aminées va diminuer de manière drastique, cette diminution est peut-être dû à l'épuisement des souches comme expliqué auparavant. Mais la chose la plus importante est le taux d'acides aminées essentielles qui ne varie que

de 0,01% parmi tous les essais et tous les paramètres testés. Ce qui explique que la composition biochimique des algues ne change pas malgré les variations des trois sources de carbone ajoutée.

Souche initiale

La souche utilisée pour l'ensemencement de mes erlenmeyers fut contrôlée tout comme mes échantillons au microscope ainsi qu'avec l'absorbance afin d'obtenir un suivi et de remarquer si la souche était toujours pure, on remarquait des colonies vertes qui sédimentait au fond de l'erlenmeyers si l'agitation était stoppée ce qui montre que la photosynthèse avait bien lieu avant que les algues se retrouvent plongées dans le noir.

La température sous la lampe était de $25\pm 1^\circ\text{C}$, c'est plus chaud que les erlenmeyers entourés d'aluminium où la température variant de 20 à 22°C . Mais avec ces légères différences températures il n'y a pas d'impact sur la croissance des *Chlorella vulgaris* [16].

Quantité mélasse/acétate

Le fait de combiner acétate de sodium et mélasse sur une souche de *Chlorella vulgaris* provient d'un article [8] qui fait pousser une souche de *Neochloris oleoabundans* en condition mixotrophe et donne un résultat favorable à la croissance avec ces deux sources de carbone. La souche de *Neochloris* contient un haut taux de lipides et elle est utilisée pour la production de biocarburant [17]. Pour corriger le fait que la production de sucre de la phase claire de la photosynthèse ne va pas pouvoir être réalisée, un ajout de CO_2 est nécessaire, car la culture va se faire en conditions hétérotrophes, c'est-à-dire entièrement dans le noir.

La quantité de mélasse optimale selon la figure 7 est de 10g/L de mélasse et de 10 g/L d'acétate ce qui est légèrement plus que dans la littérature [8] où la croissance optimale est à 7,5 g/L de glucose et d'acétate. La différence observée provient du fait que la culture de *Neochloris* a été fait en conditions de mixotrophie qui a permis le développement des molécules nécessaire à l'assimilation de l'acétate de sodium.

Le rendement maximal obtenu est de 0,37g/L ce qui est plus faible que la plupart des rendements obtenus dans la littérature [18], cela est dû aux conditions de culture qui n'est pas optimale pour une espèce d'algues ayant beaucoup de chlorophylle. Le fait de cultiver dans le noir induit un rendement plus bas ce qui est acceptable.

Influence du CO_2

Tout d'abord, les petites variations d'alimentation n'influencent pas la croissance des algues, aucune tendance ne peut être tirées des courbes d'alimentation en CO_2 par rapport à l'absorbance mesurée au fil des jours.

Un essai sans CO_2 a été fait afin de voir son impact réel sur le milieu, on remarque [figure 10] que le CO_2 permet une croissance continue des algues. L'absorbance de l'échantillon sans CO_2 décroît légèrement au bout du 4^{ème} jours sans nouvel apport de carbone [figure 10].

Les courbes représentant l'évolution du pH au fil des jours dans les milieux de culture montre une certaine stabilité du pH pour l'échantillon sans CO_2 [figure 12]. Car le CO_2 acidifie le milieu de culture dans lesquelles il se trouve, il peut ainsi être assimilé.

Influence de l'acétate de sodium :

L'ajout d'acétate de sodium a été varier afin d'observer s'il y avait un effet sur la croissance dû à l'acétate uniquement. Les rendements obtenus [Figure 9] montre que les souches de *Chlorella* poussent malgré un faible taux d'acétate de sodium et que le rendement peut être identique avec 4g/L d'acétate de sodium qu'avec 10g/L.

Les essais suivants [Figure 11] montre une meilleure croissance et un rendement meilleur dans les milieux de croissance ne contenant pas d'acétate de sodium.

L'hypothèse que l'acétate de sodium ne permet pas la croissance des *Chlorella vulgaris* en condition

d'hétérotrophie a été confirmée par des essais sur des volumes de 1 litres. Les courbes d'absorbance [Figure 13] ainsi que les rendements [Figure 14] prouvent le fait que l'acétate de sodium n'est pas à favoriser dans ce type de culture. En effet, il a été prouvé que l'assimilation de l'acétate par les algues bleu-vertes est très réduite en l'absence de CO₂ et est dépendante de la lumière [19]. L'acétate ne permet pas la respiration cellulaire dans les algues bleu-vertes en conditions hétérotrophes et sans apport de carbone [20]. Les algues vertes sont limitées dans l'utilisation de substance organiques pour croître et produire de l'énergie [21]. Il faut une source de carbone et sans lumière la respiration reste quand même limitée et devient 20% moins importante qu'en conditions de lumière [22].

L'acétate de sodium permet de tamponner légèrement le pH, de manière générale aucun échantillon contenant au moins 2g/L d'acétate de sodium n'est descendu en dessous d'un pH de 5 alors que les échantillons contenant de la mélasse descendent beaucoup plus bas jusqu'à un pH de 4,2 [Figure 12]. Le fait de ralentir l'acidification du milieu et de tamponner le pH ne permet pas d'assimiler la totalité du CO₂ car une partie se trouve sous la forme d'HCO₃⁻ qui avec un pH plus élevé que 4,75 se retrouve solubles dans le milieu [Figure 16].

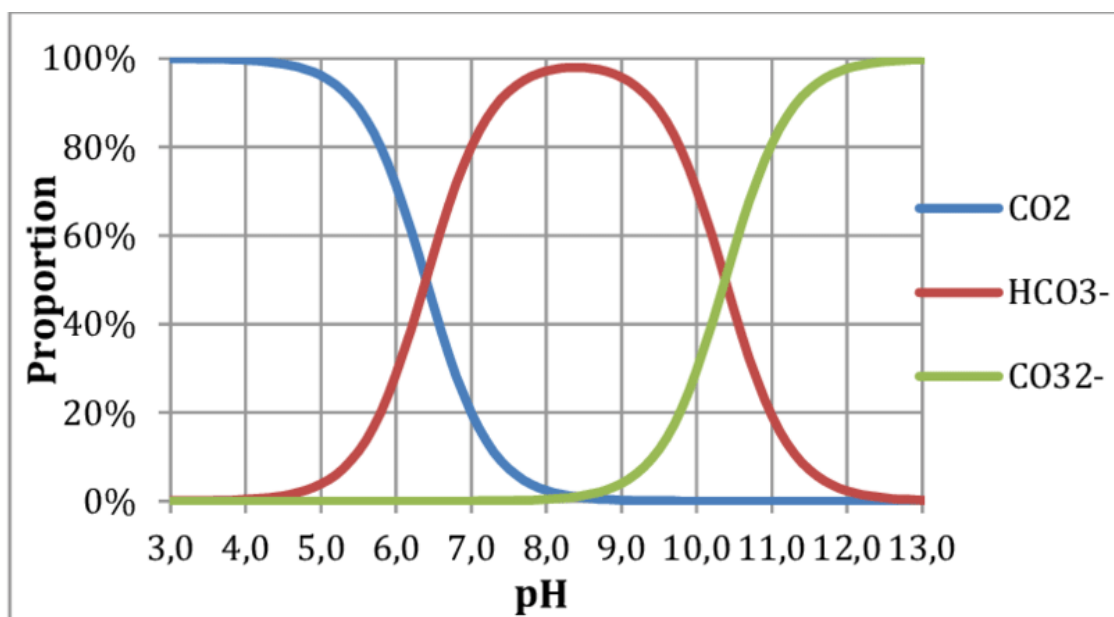


Figure 16 Solubilisation du dioxyde de carbone en fonction du pH

Le milieu est privé de 20% de son apport en CO₂ pendant au moins 2 jours puis les algues acidifient le milieu rendant ainsi plus de CO₂ disponible et accroît ainsi la croissance.

Une tendance est observée aussi concernant les acides aminés et les protéines entre les échantillons contenant pas ou peu d'acétate de sodium avec les échantillons en contenant beaucoup. L'analyse Kjeldahl montre une augmentation du taux de protéines dans l'échantillon contenant 2 g/L d'acétate plus élevée de 5% de l'échantillon contenant 10g/L d'acétate [Tableau 4]. Il y a un effet possible de l'acétate de sodium sur le taux de protéine mais aucune étude n'a été publiée avec ces paramètres et ces résultats. Les glucides et les lipides sont des molécules de stockage, tandis que les protéines sont des biomolécules de structures. Par conséquent, une augmentation de la teneur en protéine suggère une augmentation de la croissance en microalgues [8]. Ce qui dans ces essais est confirmé avec l'augmentation du rendement pour les analyses ayant peu d'acétate de sodium [Figure 14]

Le taux des quatre acides aminés ou l'acétate de sodium est métabolisé est légèrement augmenté [Tableau 3], mais cela n'a pas un véritable impact sur la composition biochimique de la souche car parmi tous les essais, la proportion d'acides aminés essentiels est semblable avec une moyenne de 40,1% et un écart-type de 0,01%.

Pour des futurs essais en conditions hétérotrophes, il faudrait favoriser les deux sources de carbone qui sont la mélasse et le CO₂ car l'acétate en croissance mixotrophiques ne présente aucun problème et améliore même la croissance mais le fait de faire pousser les algues dans le noir limite leur capacité à métaboliser et produire de l'énergie.

Selon [23], la croissance avec CO₂ est acétate de sodium et tout à fait possible en conditions mixotrophiques.

Influence du pH

Les algues ont tendances à alcaliniser le milieu mais dans le ce cas, avec l'ajout de mélasse ainsi que du CO₂, on obtient une acidification forte du milieu qui a été premièrement stabilisée au début de l'inoculation avec du NaOH 0,1 mol/L afin que les algues se familiarise avec le nouveau milieu.

Avec un pH plus acide, on favorise la production de lipides [24] ainsi que la croissance est favorisée avec l'ajout de CO₂ [24]. Ce qui correspond à notre cas d'étude car le CO₂ lorsqu'il est pleinement sous sa forme diatomée accroît l'acidification et la croissance des essais.

Taux de protéines et acide aminés

Le taux de protéines déterminé est moins élevé que celui retrouvées dans la littérature [25] qui varient de 50 à 60 % car avec ces conditions d'hétérotrophie en milieu acide ce sont les lipides qui sont plutôt produits afin de stocker l'énergie au lieu de produire un réseau de protéine [24].

Lorsque seulement de l'acétate et du CO₂ sont ajoutés au milieu le pH ne varie que très peu [23] et reste à un pH variant de 7 à 9, c'est donc bien la mélasse qui à cet effet sur l'acidification en milieu hétérotrophes.

Huit des neufs acides aminés essentielles sont présent dans les protéines de *Chlorella vulgaris*, il manque le tryptophane qu'on peut retrouver dans le riz complet. Un plat de riz complet soupoudré de *Chlorella vulgaris* séchées permettra d'obtenir les 9 acides aminés essentiels en un repas très simple.

Perspective pour le futur :

Avec le temps que les expériences ont pris ainsi que le temps mis à disposition, tous les essais voulu pour caractériser tous les aspects de la souche de *Chlorella vulgaris* n'ont pas pu être accompli. Il faudrait réaliser une série d'essais supplémentaire. Les rendements des essais à 300ml étant presque semblables à ceux de 1 litres, les prochains essais devraient tous être réalisé dans un volume de 1 litres afin d'obtenir assez d'algues sèches pour pouvoir faire les analyses de protéine au Kjeldahl en triplicata ainsi qu'une analyse des acides gras ou du taux de lipides serait utile.

Pour corriger la baisse de rendement observée dans les essais de 1 litres, il faudrait agiter les milieux et administrer le CO₂ de manière qu'ils se solubilise directement et se fasse capter immédiatement par les molécules d'algues.

Afin de pouvoir augmenter le nombre d'analyse, il faudrait faire pousser les algues sur une durée de 6 jours, c'est la ou la croissance arrive à son maximum [26].

Pour *Chlorella sorokiniana*, le taux d'acides gras non-saturé diminue lorsque la culture se fait en hétérotrophie, il faudrait vérifier si cela est pareil du côté de la souche de *Chlorella vulgaris* si le but est d'en faire un complément alimentaire.

L'analyse de la mélasse utilisée serait importante pour savoir quels sucres sont présent et l'utilisation de différente mélasse avec différentes compositions en monosaccharide ou disaccharides pourrait optimiser le type de sucre que *Chlorella vulgaris* assimile le plus facilement.

Il faudrait faire des essais dans des bioréacteur afin de pouvoir maîtriser complètement le débit de CO₂ ajoutés à chaque essai, observer la respiration des algues en regardant la consommation d'oxygène faite au cours des jours.

Il faut tester si *Chlorella vulgaris* capte correctement le CO₂ ambiant ou s'il faut le concentrer et le faire

venir à l'intérieur du milieu comme fait durant ce travail.

Des tests avec l'ajout d'acétate de sodium avec du CO₂ pourrait être intéressant.

Si le but est dans faire un complément alimentaire, il serait plus favorable au niveau du rendement est de la composition biochimique pour les acides gras essentiellement de faire une culture en photo réacteur tubulaire en milieu mixotrophes

Une fois tous ces tests réalisés et que la souche de *Chlorella vulgaris* est caractérisée, un prototype pourrait être imaginé afin de voir dans une usine de production de sucre, si une installation serait possible. Une production d'algues entièrement autonome qui pourrait fournir des compléments alimentaires pour hommes ou animaux, très protéiné avec huit des neuf acides aminés essentielles présent en grande quantité et avec les acides gras les plus recherché dans la nutrition serait peut-être possible avec cette espèce d'algues.

5. Conclusion :

La souche d'algues *Chlorella vulgaris* est une algue qui permet une croissance en conditions hétérotrophes si elle se trouve dans un milieu avec suffisamment de carbone assimilable tel que le glucose ou le CO₂. Le fait que les *Chlorella vulgaris* poussent en utilisant mélasse et CO₂ permettrait une installation dans une usine sucrière afin de revaloriser les déchets. Le rendement n'est pas grand en hétérotrophie mais avec un peu d'ajustement sur la manière de cultiver ces algues tels que l'agitation, le volume ou le pH, il est possible d'obtenir de meilleurs résultats.

Le rendement maximal obtenu est de 0,37g/L avec comme paramètre 10g/L de mélasse ainsi que 10g/L d'acétate, le taux d'acides aminés essentielles moyen obtenu est de 40,1±0.01% ce qui indique que la composition en acides aminés n'est pas influencée par la variabilité des paramètres. Le taux de protéines est bas, il est de 25% mais c'est normal pour les conditions dans lesquelles ce sont retrouvées les souches de *Chlorella vulgaris*.

Ce projet est très intéressant car il est dans l'air du temps et correspond bien aux problématiques du monde actuelles. Les algues sont une solution pour obtenir un avenir plus sain et plus écologique pour tous le monde, c'est un relativement bon marché et qui à un bilan carbone positif contrairement à la quasi-totalité de la nourriture produite ou du carburant. Ce sujet est complexe est le sujet d'étude reste une plante vivante, beaucoup d'études sont faites sur ces algues actuellement et cela restera étudié dans le futur vu le nombre d'espèce disponibles ainsi que les multiples propriétés de reproduction et de production d'énergie des algues.

6. Bibliographie

- [1] Chisti Y., Biodiesel from microalgae, elsevier, 294-306 (2007)
- [2] Lucchetti A., Modélisation et conception d'un système de culture de microalgues, HAL, 2014
- [3] Cadoret J-P. , Bernard O., La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : Promesse et défis, Société de Biologie, p. 201-211 (2008)
- [4] Chisti Y., Biodiesel from microalgae, elsevier, 294-306 (2007)
- [5] Yuan-Kun Lee, Microalgal mass culture systems and methods : Their limitation and potential, Journal of applied Phycology, p. 307-315 (2001)
- [6] Raso S., van Genugten B., Vermué M., Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. At low light intensity, Journal of applied Phycology, p. 863-871, (2012)
- [7] Introduction *Chlorella vulgaris* health, 03_introChlorellavulghealth.pdf
- [8] Rodrigues Silva R., Prete C., Zambrano F., de Mello V. , Tischer C. Andrade D., Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions, Springer, (2016)

- [9] Perez-Garcia O., Escalante F., de-Bashan L., Bashan Y, Water research, p.11-36 (2011)
- [10] Yuan-Kun Lee, Microalgal mass culture systems and methods : Their limitation and potential, Journal of applied Phycology, p. 307-315 (2001)
- [11] M.Forrest Blair, B. Kokabian, V. Gnaneswar Gude, Light and growth medium effect on Chlorella vulgaris biomass production, journal of environmental chemical engineering, p665-674 (2014)
- [12] Chlorella vulgaris sur milieu dit BG11,
http://www.perrin33.com/microbiologie/metabolismes/analysmilieu_3.php (12.08.19)
- [13] M. M. El-Sheekh*, M. Y. Bedaiwy, M. E. Osman, M. M. Ismail, Influence of Molasses on Growth, Biochemical Composition and Ethanol Production of the Green Algae Chlorella Vulgaris and Scenedesmus Obliquus, Journal of agriculture engineering and biotechnology, p 20-28 (2014)
- [14] Khoeyi Z., Seyfabadi J. Ramezanpour Z., Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*, Aquaculture international vol 20, p 41-49, (2012)
- [15] D. S. Hoare, S. L. Hoare and R. B. Moore, The Photoassimilation of Organic Compounds by Autotrophic Blue-green Algae, Microbiology society Vol 49 issue 3, (1967)
- [16] Hermann Endres H., Modeling temperature and microalgae productivity for photobioreactors in industrial-scale cultivation plants, Fakultät für Chemie (2017)
- [17] H. C. Greenwell , L. M. L. Laurens , R. J. Shields , R. W. Lovitt and K. J. Flynn, Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges, Journal of the royal society interface, (2009)
- [18] Ângelo Paggi Matos & Weruska Brasileiro Ferreira & Regina Coeli de Oliveira Torres & Luiz Rodrigo Ito Morioka & Maria Helena Machado Canella & Jefferson Rotta & Tiago da Silva & Elisa Helena Siegel Moecke & Ernani Sebastião, Sant'Anna, Optimization of biomass production of Chlorella vulgaris grown in desalination concentrate, Journal of applied phycology. P. 1473-1483 (2015)
- [19] Hoare D s, Moore R B, The Photoassimilation of Organic Compounds by Autotrophic Blue-green Algae, Biochimica et Biophysica Acta, (1965)
- [20] Pearce J., Carr N. G., The Metabolism of Acetate by the Blue-green Algae, Anabaena variabilis and Anacystis nidulans J. Gen. Microbiol. P. 301-313, (1967)
- [21] G. Fogg, The Blue-Green Algae, Academic press London, p.163
- [22] G. Fogg, The Blue-Green Algae, Academic press London, p.164
- [23] Lizzul A., Amundararain A., Purton S., Campos L., Characterization of Chlorella sorokiniana, University of London, (2018)
- [24] Renhe Q. SongGaob P., A.Lopez, Kimberly L., Effects of pH on cell growth, lipid production and CO2 addition of microalgae Chlorella sorokiniana, Algal research, p. 192-199, (2017)
- [25] Eniyidi U., Chlorella vulgaris as Protein Source in the Diets of African Catfish Clarias gariepinus, Department of Fisheries and Aquatic Resources Management, (2017)
- [26] Piotrowska A., Czerpak R. Cellular response of light/dark-grown green alga Chlorella vulgaris Beijerinck (Chlorophyceae) to exogenous adenine- and phenylurea-type cytokinins, Acta Physiol Plant, p. 573-585, (2009)

Annexe

1. Recette du BBM 3N
2. Résultats Brut croissance des essais de 1 à 4
3. Résultats Kjeldahl
4. Résultats acides aminés

1. BBM 3N

Purpose

Media composition Bold's Basal Medium **BBM**
(Thesis Maren Kruus) 1x 10x

Ingredients	Mr	1x		10x	
		g/l	Mol	g/l	
NaNO ₃	85.01	0.250	0.00294	2.50	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	0.075	0.000304	0.75	
NaCl	58.44	0.025	0.000428	0.25	
K ₂ HPO ₄	174.18	0.075	0.000431	0.75	
KH ₂ PO ₄	136.09	0.176	0.00129	1.76	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.01396	0.025	0.00017	0.25	

Stock solution 10x (100ml/L)

for sterile filtration (so prepare a Duran empty bottle already autoclaved)

Ingredients	Mr	100x			
		g/l	Mol	g/l	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	0.009	3.07E-05	0.88	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	197.91	0.001	7.28E-06	0.14	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.00119	4.93E-06	0.12	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.6	0.002	6.29E-06	0.16	
CoCl ₂ ·2H ₂ O	237.93	0.0004	1.68E-06	0.04	
H ₃ BO ₃	61.83	0.011	0.000185	1.14	
EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O	372.24	0.064	0.000171	6.37	
KOH	56.1056	0.031	0.000553	3.10	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.02	0.005	1.79E-05	0.50	

Stock solution 100x (10ml/L)

for sterile filtration (so prepare a Duran empty bottle already autoclaved)

MEDIUM PREPARATION (example for 1L)

Autoclave only water or sterile filtration	890	ml
Add stock solution (10x) of BBM or 3NBBM	100	ml
Add stock solution (100x) of Trace Element Sol.	10	ml

1000 L

Stock
solution
10x
100ml/L)

Media composition	3 N Bold's Basal Medium		3NBBM	
(Thesis Maren Kruus)		1x		10x
Ingredients	Mr	g/l	Mol	g/l
NaNO ₃	85.01	0.750	0.00882	7.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	0.075	0.000304	0.75
NaCl	58.44	0.025	0.000428	0.25
K ₂ HPO ₄	174.18	0.075	0.000431	0.75
KH ₂ PO ₄	136.09	0.176	0.00129	1.76
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.01396	0.025	0.00017	0.25

for sterile filtration (so prepare a Duran empty bottle already autoclaved)

2. Résultats brut

Essais 1	Jour	j-0	j-2	j-4	j-8	j-10
	A 0/0	0,355	0,219	0,325	0,294	0,305
	B 2/2	0,426	0,239	0,377	0,446	0,466
	C 4/4	0,509	0,219	0,507	0,789	0,865
	6g/L Mélasse €	0,61	0,27	0,429	0,463	0,464
	8g/L Mélasse €	0,68	0,339	0,56	0,668	0,733
	10g/L Mélasse	0,767	0,326	0,69	0,698	1,163
pH	A 0/0	7,3	5,75	5,9	5,5	5,45
	B 2/2	5	5,9	6,3	6,3	6,6
	C 4/4	4,8	6,4	6	6,2	6,1
	6g/L Mélasse €	4,75	5,9	6,1	6,1	5,7
	8g/L Mélasse €	4,75	5,9	5,9	5,9	5,6
	10g/L Mélasse	4,75	6,2	6,3	6,2	5,9
essais 2	j-0	j-2	j-8	j-10	rendement g	
10g/L Mélasse	0,406	0,782	0,7	0,706	0,19084337	
10g/L Mélasse	0,39	0,621	0,724	0,816	0,16705882	
10g/L Mélasse	0,34	0,564	0,608	0,67	0,17911111	
10g/L Mélasse	0,348	0,433	0,502	0,545	0,18766355	
10g/L Mélasse	0,332	0,437	0,508	0,564	0,19090909	
	6,6	5,5	5,5	5,3		
	6,4	5,85	5,4	5,4		
	6	5,8	5,6	5,6		
	5,2	5,6	5,6	5,35		
	5,4	4,8->5,5 stab	5,5	5,4		
	5,6	5,2->5,5 stab	5,5	5,4		

Essais 3	Absorbance					Rendement g/L	pH					
	J-0	j-2	j-6	j-8	j-10		0 J-0 (Stabilisé	j-2	j-6	j-8	j-10	
10g/L Mélass	0,662	0,991	1,043	1,045	1,057	0,154	10g/L Mélass	6,45	5,6	5,1	5	4,9
10g/L Mélass	0,673	1,03	1,141	1,126	1,17	0,143	10g/L Mélass	6,4	5,6	5	5	4,9
C 10M/2A (1	0,922	0,97	1,817	1,768	1,775	0,351	C 10M/2A (1	7,2	5,5	5,2	5	5
D 10M/10A (0,638	0,754	0,855	0,855	0,876	0,159	D 10M/10A (5,6	5,6	5,6	5,6	5,4
10g/L Mélass	0,754	1,081	1,13	1,159	1,21	0,191	10g/L Mélass	6,6	5,4	4,5	4,5	4,3
10g/L Mélass	0,867	1,246	1,348	1,365	1,41	0,209	10g/L Mélass	6,6	5,3	4,5	4,4	4,2
10g/L Mélass	0,853	1,24	1,218	1,15	1,157	0,186	10g/L Mélass	6,5	5,5	4,6	4,6	4,5
essais 4	Résultats selon absorbance							Rendements				
	j-0	J-2	J-4	J-8	J-10							g/L
10 g/L mélas:	0,538	0,709	0,695	0,79	0,82			10 g/L mélas:				0,148
10 g/L mélas:	0,525	0,768	0,707	0,725	0,71			10 g/L mélas:				0,137
10 g/L mélas:	0,414	0,69	0,636	0,608	0,595			10 g/L mélas:				0,125
pH	6,8	5,1	4,5	4,10	4,00							
	7,3	5,4	5,3	5,2	5							
	6,7	5,6	5,5	5,2	5,2							

3. Kjeldahl

Nom échanti	Poids (g)	Volume titrant	Volume -Blanc (ml)	Conc H2SO4	mol échanti	g N	Facteur	%Protéine pour 100g			
Blanc 1		0,273	Moyenne	0,25		14,0067	6,25	100			
Blanc 2		0,27	0,2715			g	%N				
Std 1 (trypto	0,245	6,83375	6,56225		0,0016	0,0230	0,1436	58,6196			
Std 2 (trypto	0,258	6,73125	6,45975		0,0016	0,0226	0,1414	54,7964			
Std 3 (trypto	0,242	6,05	5,7785		0,0014	0,0202	0,1265	52,2583			
C3-1	0,136	1,99	1,7185		0,0004	0,0060	0,0376	27,6545	Moyenne	écart-type	CV
C3-2	0,155	2,05125	1,77975		0,0004	0,0062	0,0390	25,1295	26,3920	1,7855	6,8
D3	0,143	1,45875	1,18725		0,0003	0,0042	0,0260	18,1703			

4. Acides aminés

Peak Name	A1 0/0	B1 2/2	C1 4/4	D1 6/6	E1 8/8	F1 10/10	B2 10/4	C2 10/6	D2 10/8	E2 10/10	F2 10/10	A3 10/2	B3 10/2	C3 10/2	D3 10/10	E3 10/0	F3 10/0	G3 10/0/0
Asp	1582,56	1201,19	1046,08	1108,71	823,84	952,56	656,21	513,27	619,22	630,74	641,05	713,15	740,39	1280,24	791,27	789,00	583,12	768,54
Glu	1800,97	1496,93	1348,84	1305,78	976,75	1226,52	744,22	634,12	674,63	704,75	740,97	822,62	859,24	1330,01	844,51	898,37	669,42	856,76
Ser	686,09	566,86	495,18	500,48	407,66	463,70	365,36	293,3	346,38	362,22	364,66	403,57	400,99	603,76	431,74	426,03	346,34	420,14
Gly	1629,22	1312,90	1229,98	1062,63	816,27	1018,10	613,25	513,85	599,22	590,40	613,04	686,78	710,29	1099,87	722,89	764,96	567,99	738,62
His	298,41	253,13	233,45	228,26	163,64	208,13	128,57	100,34	118,73	108,36	122,24	137,08	139,20	238,82	154,35	146,41	116,08	145,30
Arg	723,59	574,78	492,92	468,28	345,97	416,98	202,15	172,12	196,09	204,43	197,98	225,97	227,31	410,62	273,1	244,72	183,62	248,05
Thr	805,49	649,55	566,33	580,34	446,49	528,22	366,99	312,67	347,89	340,48	346,81	415,91	396,77	650,78	466,54	420,55	335,48	436,44
Ala	1914,36	1469,78	1483,82	1354,46	1028,47	1394,67	625,67	483,28	662,71	611,89	623,94	720,8	755,16	1175,02	925,14	807,60	557,16	869,90
Pro	691,66	569,47	512,11	491,03	387,15	462,32	306,43	241,17	304,04	302,13	304,03	335,94	339,43	510,71	368,61	359,65	275,59	352,47
Tyr	295,44	188,18	147,60	188,62	156,69	189,05	111,58	86,73	122,88	113,47	101,42	143,4	145,96	198,04	153,66	155,45	113,71	151,65
Val	1356,64	1065,35	1052,84	1052,42	694,01	951,20	445,36	359	443,69	445,02	443,15	589,02	615,57	948,43	594,77	660,17	444,17	610,19
Met	247,52	140,97	129,63	147,34	78,73	117,70	38,32	46,11	43,74	46,09	36,28	61,93	54,11	148,36	85,89	67,19	35,33	68,26
Ile	741,00	633,06	591,59	586,58	416,55	500,39	319,93	251,41	315,64	326,15	328,62	381,92	378,05	745,74	448,42	421,04	306,54	402,17
Leu	1276,90	1050,92	943,80	958,38	651,68	866,63	494,19	388,13	486,67	497,64	503,13	562,72	563,93	1000,77	642,82	621,64	448,09	593,95
Phe	565,93	471,30	406,32	417,82	284,13	370,21	219,46	176,56	218,85	224,78	230,42	271,97	273,73	464,31	295,69	290,29	205,91	272,72
Lys	836,58	717,80	644,18	617,53	487,53	541,63	385,30	278,89	370,65	374,92	405,43	478,81	453,74	879,98	529,89	512,98	388,60	484,76
Total	15452,36	12362,18	11324,66	11068,64	8165,56	10207,98	6023,00	4850,96	5871,04	5883,48	6003,18	6951,6	7053,87	11685,46	7729,3	7586,05	5577,15	7419,92
AA Essentiel	0,40	0,40	0,40	0,41	0,39	0,40	0,40	0,39	0,40	0,40	0,40	0,42	0,41	0,43	0,42	0,41	0,41	0,41
Moyenne		0,41																
Ecart type		0,01007043																