

Fermentation d'un résidu de *Chlorella vulgaris* par *Yarrowia lipolytica* pour la synthèse d'acides gras polyinsaturés à destination d'applications nutraceutiques

Résumé

Energie, alimentation, agriculture ou santé, l'utilisation des microalgues est aussi vaste que leurs diversités. Ces microorganismes photosynthétiques et aquatiques se présentent comme une solution idéale pour répondre aux nombreux enjeux environnementaux du 21^{ème} siècle. Toutefois, avec l'augmentation de leur utilisation, la production de résidus risque de poser un problème dans les décennies à venir. Certains acteurs du marché se penchent déjà sur la question au travers de la digestion anaérobie par exemple. Dans ces travaux, il s'agit de proposer une nouvelle voie de valorisation des résidus microalgaux, celle de la fermentation par des levures oléagineuses. L'objectif est de prétraiter le moins possible le résidu de microalgues (*Chlorella vulgaris*) et de produire des composés à hautes valeurs ajoutées (lipides et acides gras insaturés).

Le choix des levures oléagineuses a été conditionné par plusieurs facteurs : les contraintes du substrat ; le procédé d'extraction de substrat pouvant générer un substrat plus ou moins fermentescible. Parmi les levures retenues, c'est *Yarrowia lipolytica* qui a pu se développer le plus rapidement sur ce type de substrat et ce, sans hydrolyse préalable du substrat. Le pH a un rôle important dans la valorisation du substrat notamment sur sa désagrégation. Il a été obtenu une meilleure croissance à pH 7,5 alors que c'est à pH 5,5 qu'est normalement obtenu la meilleure croissance. C'est également à ce pH qu'il a été obtenu la meilleure production d'acide gras. Un autre fait surprenant est la synthèse de l'acide α -linoléique par *Y. lipolytica* JMY3501 à pH 7,5. En effet, cette souche est normalement dépourvue d'enzyme capable de synthétiser ce composé. L'acide α -linoléique appartient à la famille des omega-3. Sa propriété la plus intéressante est sa capacité à réduire le risque de maladie cardiovasculaire.

La cytométrie de flux couplée au marqueur BODIPY 493/503 a permis de distinguer les levures du résidu de microalgues ; de suivre leurs croissances ainsi que leurs accumulations de lipides. Les résultats montrent que l'intensité de fluorescence du marqueur semble être influencée par la quantité de lipides neutres mais également par le nombre d'insaturation que comporte les chaînes carbonées. La position de cette insaturation aurait également une influence sur l'intensité de fluorescence finale. L'accumulation de l'acide α -linoléique ne s'effectuant que sur le substrat de *C. vulgaris*, l'ultracentrifugation a été explorée pour séparer la levure du substrat afin de confirmer que cet acide est bien produit par la levure.

L'ultracentrifugation a permis de séparer une partie de la population de *Yarrowia lipolytica* du substrat de microalgues. La vitesse d'accélération optimale est établie à 14 571 g pour une concentration en Percoll® de 75 %. L'observation microscopique a révélé que la majorité des levures sont retrouvées dans la phase inférieure. L'intensité de fluorescence de ces levures après marquage au BODIPY 493/503 a permis de conclure à une forte accumulation de lipides. Toutefois, la population retrouvée dans la phase supérieure, bien que de taille plus petite, a montré une intensité de fluorescence plus importante, laissant présager une forte accumulation de lipides insaturés.

Mots clés :

Yarrowia lipolytica, *Chlorella vulgaris*, coproduits, accumulation de lipides, acide α -linoléique, cytométrie de flux

Fermentation of *Chlorella vulgaris* residue by *Yarrowia lipolytica* for the synthesis of polyunsaturated fatty acids for nutraceutical applications

Abstract

Energy, food, agriculture or health, the use of microalgae is as huge as their diversity. These photosynthetic and aquatic microorganisms are an ideal solution to answer environmental challenges of the 21st century. However, with the increase in their uses, by-products production could be posing a problem in the coming decades. Some market players are already looking into the issue through anaerobic digestion. In this work, the aim is to propose a new way for microalgal residues valorization by fermentation using oleaginous yeasts. The objective is to transform the microalgae by-products (*Chlorella vulgaris*) with less pretreatment into compounds with high added values (lipids and unsaturated fatty acids).

The choice of oleaginous yeasts was conditioned by several factors: constraints of the substrate; substrate extraction process being able to generate a more or less fermentable substrate. Among the yeasts selected, *Yarrowia lipolytica* was able to develop the most rapidly on this type of substrate, without prior hydrolysis of the substrate. The pH played a central role in the valorization of the substrate on its disintegration. The best growth was obtained at pH 7.5 whereas in normal conditions, it was obtained at pH 5.5. It is also at this pH that the best fatty acids production was obtained. Another unexpected fact is the synthesis of C18:3 by *Y. lipolytica* JMY3501 at pH 7.5. Indeed, this strain is normally devoid of an enzyme capable of synthesizing this compound. α -linolenic acid belongs to the omega-3 family. Its most interesting property is its ability to reduce the risk of cardiovascular disease.

Flow cytometry coupled to the BODIPY 493/503 marker made it possible to distinguish the yeasts from the microalgal residue; to follow their growth as well as yeast lipid accumulation. The results show that marker fluorescence intensity seems to be influenced by the amount of neutral lipids but also by the number of unsaturation in the carbon chains. The position of this unsaturation would also have an influence on the final fluorescence intensity. As the accumulation of C18:3 occurs only in the *C. vulgaris* substrate, ultracentrifugation was explored to separate the yeast from the substrate to confirm that this acid is indeed produced by the yeast.

Ultracentrifugation allowed to separate a part of the *Yarrowia lipolytica* population from the microalgal substrate. The optimum acceleration rate is 14 571 g for a Percoll® concentration of 75%. Microscopic observation revealed that most of the yeasts are found in the lower phase. The fluorescence intensity of these yeasts after labeling with BODIPY 493/503 led to conclude at a high accumulation of lipids. However, the population found in the upper phase, although smaller in size, showed greater fluorescence intensity, suggesting a high accumulation of unsaturated lipids.

Keywords:

Yarrowia lipolytica, *Chlorella vulgaris*, by-products, lipids storage, α -linolenic acid, flow cytometry.