

ÉVALUATION DE LA BIOMASSE D' *AURANTIOCHYTRIUM MANGROVEI* COMME INGRÉDIENT POUR L'ALIMENTATION DE JUVÉNILES DE BAR, *DICENTRARCHUS LABRAX*

Philippe Soudant¹, Mariana Ventura¹, Luc Chauchat¹, Maurean Guerrero¹, Margaux Mathieu-Resuge¹, Fabienne Le Grand¹, Antoine Bideau¹, Gwendoline Lefebvre¹, Victor Simon¹, Sophie Collet¹, José Zambonino¹, David Mazurais¹, Nelly Le Goïc¹, Adeline Bidault¹, Christophe Lambert¹, Fleuriane Fernandes², Alla Silkina², Marcella Fernandes De Souza³, and Denis de la Broise¹

¹ Univ Brest, CNRS, IRD, Ifremer, LEMAR, F-29280 Plouzané, France

² AlgaeWales Research Group, Centre for Sustainable Aquatic Research (CSAR), College of Science, Bioscience department, Swansea University, Singleton Park, Swansea SA2 8PP, UK

³ Department of Green Chemistry & Technology, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure Links 653, 9000, Ghent, Belgium

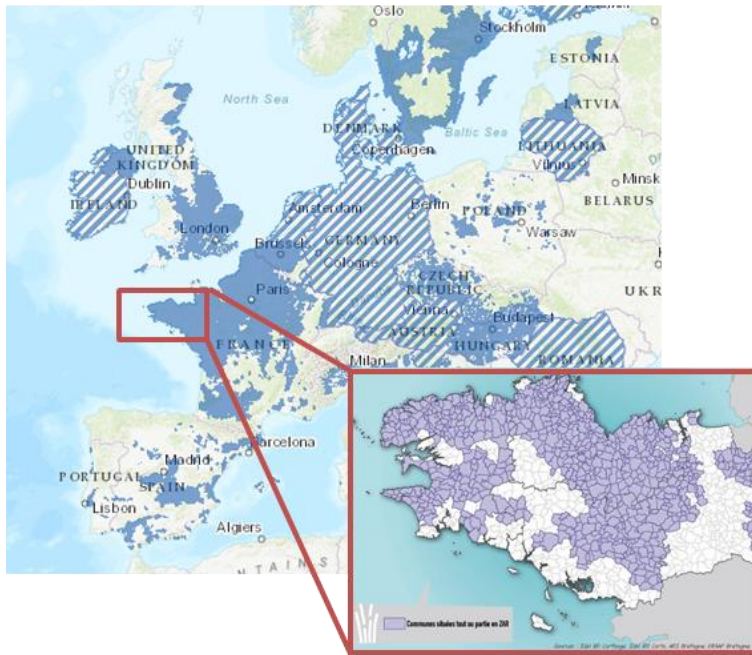
LE projet INTERREG NWE **ALG-AD** project / CONTEXTE



- Des quantités croissantes de déchets organiques sont traitées par méthanisation en Europe du Nord-Ouest.
- Mais cela produit des volumes croissants d'effluents riches en nutriments (N, P, K ...).

ZONES VULNÉRABLES AUX NITRATES EN EUROPE

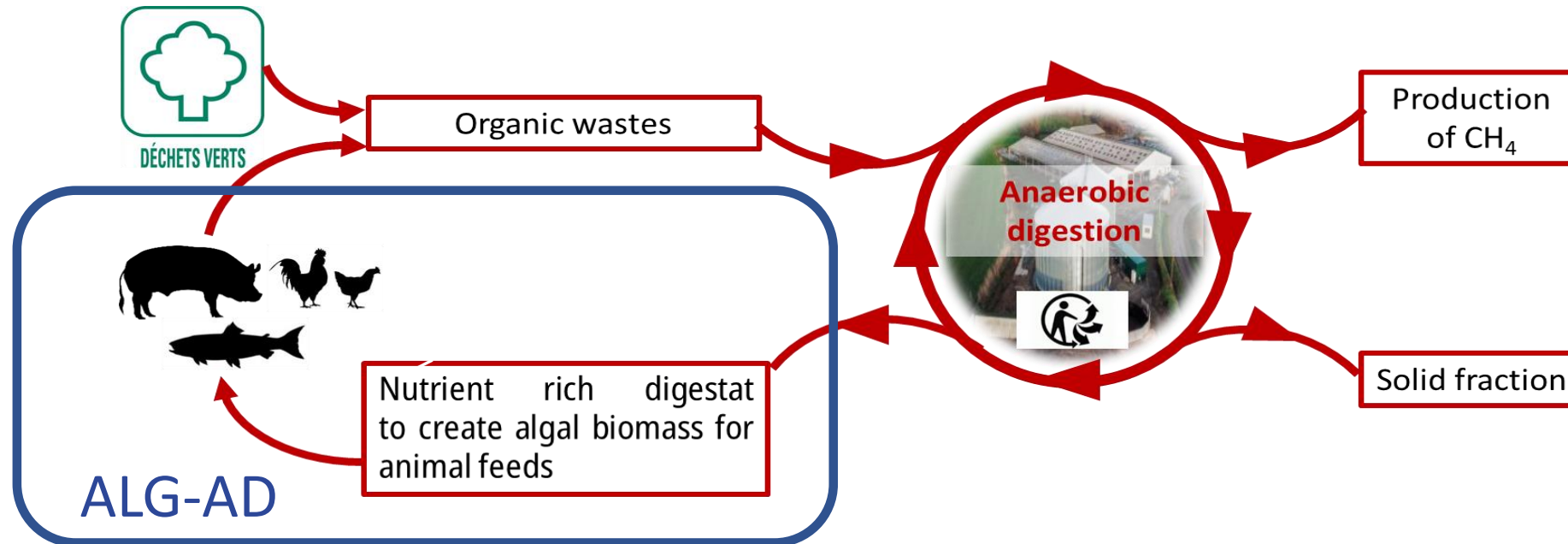
- Ces effluents riches en nutriments ne peuvent pas tous être épandus comme biofertilisants dans les zones vulnérables aux nitrates ($< 170\text{kg N /ha/an}$)
- Zones d'actions renforcées $< 50\text{kg de N/ha/an}$



- Mais ils peuvent être valorisés par des cultures de microalgues

ECONOMIE CIRCULAIRE

- ALG-AD : Valorisation des déchets riches en nutriments par l'intégration des technologies de la méthanisation et de la production de microalgues



- Produire de la biomasse en utilisant le digestat dans des installations pilotes.
- **Valorisation: utiliser la biomasse dans les aliments pour animaux et réaliser des tests zootechniques**
- Analyse du marché et développement d'outils d'aide à la décision

VALORISATION : TRANSFORMER LA BIOMASSE ALGALE EN PRODUITS COMMERCIAUX

Activity 1: Suivi, récolte et stockage de la biomasse algale

Activity 2: Fractionnement et caractérisation de la biomasse algale

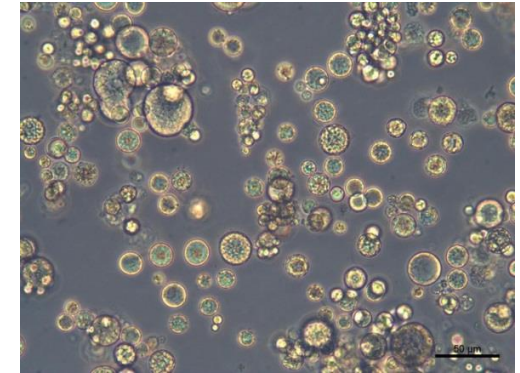
Activity 3: Formulation, essais de nutrition, et analyse du marché



VALORISATION

Activité 1 : Suivi, récolte et stockage de la biomasse algale

- Évaluation de la qualité de la biomasse
 - Suivi cellulaire (microscopie et cytométrie de flux)
 - Suivi biochimique des composés d'intérêt
- Récolte de la biomasse cultivée
 - Utilisation de la filtration tangentielle pour passer de 10-12 g/L à 100-120 g/L (>10% de contenu solide)



VALORISATION

Activité 1 : Suivi, récolte et stockage de la biomasse algale

- Le stockage est essentiel dans le traitement aval
 - Congelé -20°C
 - L'espace pour de longues périodes est rapidement un problème
 - Durée (stabilité des caractéristiques de la biomasse)
 - Le transport vers le traitement aval peut être coûteux et risqué.
 - Lyophilisation et séchage par atomisation
 - La lyophilisation est coûteuse, tandis que le séchage par atomisation peut nécessiter l'ajout d'antioxydants.
 - À prendre en compte lorsque la biomasse est destinée à être utilisée dans son intégralité.
 - Sinon, économiquement et énergétiquement inefficace si le traitement aval nécessite une réhydratation (ex : hydrolyse) pour le fractionnement.



VALORISATION

Activité 2 : Fractionnement et caractérisation de la biomasse

- Les processus de fractionnement dépendent de
 - Produits/composés ciblés (oméga 3, peptides, ...)
 - Considérations environnementales (empreinte carbone, consommation d'eau, produits chimiques utilisés, ...)
- ALG-AD : Dissociation et fractionnement des cellules par hydrolyse enzymatique
 - Respect de l'environnement pour l'extraction des lipides
 - Production de peptides "bioactifs" (antimicrobiens, immunomodulateurs, antioxydants, ...)



- Lyophilisation de la biomasse non-hydrolysée (juvénile) et hydrolysée (larves)
- Formulation des aliments pour poissons : la biomasse (non-hydrolysée et hydrolysée) séchée d'*Auranthiochytrium mangrovei* a été intégrée à 15 % dans des aliments standards (en recherche)

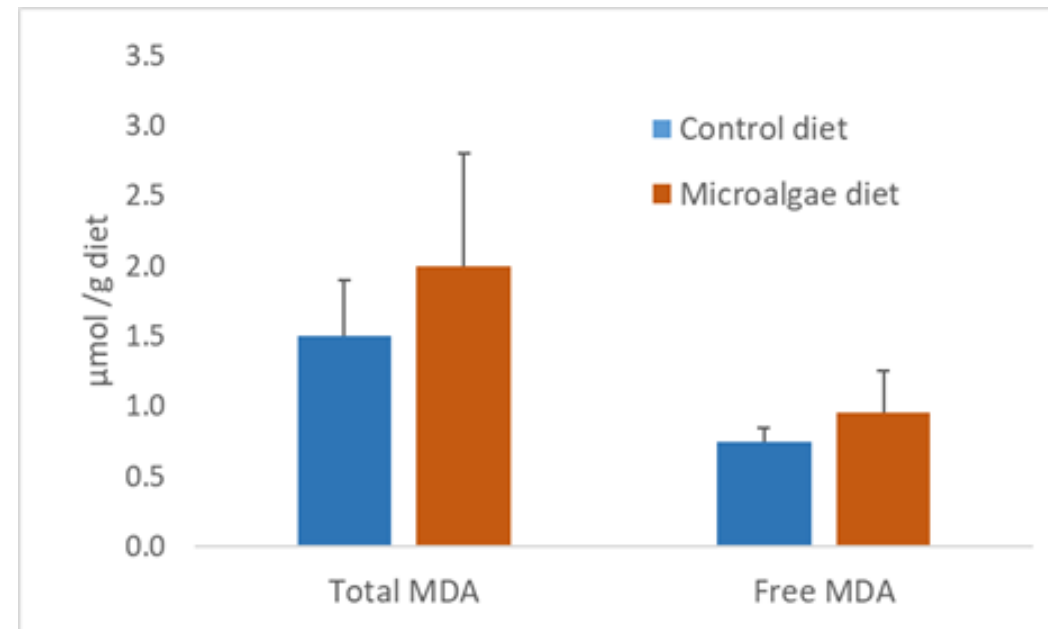
		ALG-AD Fr	Control
Fish meal	52	64	
Proteins %	74.7	35.4	43.6
Lipids %	7.5	3.6	4.4
EPA+DHA % lip	20.9	0.7	0.8
DM %	91.3		
P20 biomass	15	0	
Proteins %	30	4.2	0.0
Lipids %	9	1.2	0.0
EPA+DHA % lip	29	0.3	0.0
DM %	95		
CPSP 90	10	10	
Proteins %	88.2	8.5	8.5
Lipids %	2.5	0.2	0.2
EPA+DHA % lip	18.1	0.0	0.0
DM %	96.18		
lipids %		5.1	4.6
EPA+DHA		1.1	0.9
fish oil		1	
EPA+DHA % lip	25	0.0	0.3
rapeseed oil	1	1	
EPA+DHA % lip			
rapeseed lecithin	13	14	
PL %	90	11.7	12.6
Starch	5	5	
Vitamin mix	3	3	
Mineral mix	1	1	
Cellulose	0	1	
Total	100	100	
Proteins % DW		48.2	52.1
Lipids % DW		17.8	18.5
EPA+DHA % DW		1.1	1.1
EPA+DHA % lipids		6.0	6.1

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Analyse de la composition des aliments

	ALG-AD feed	Control feed
20:5n-3 % lipids	2.0	3.4
22:6n-3 % lipids	9.0	4.4
EPA+DHA % lipids	11.0	7.8
DHA/EPA	4.5	1.3



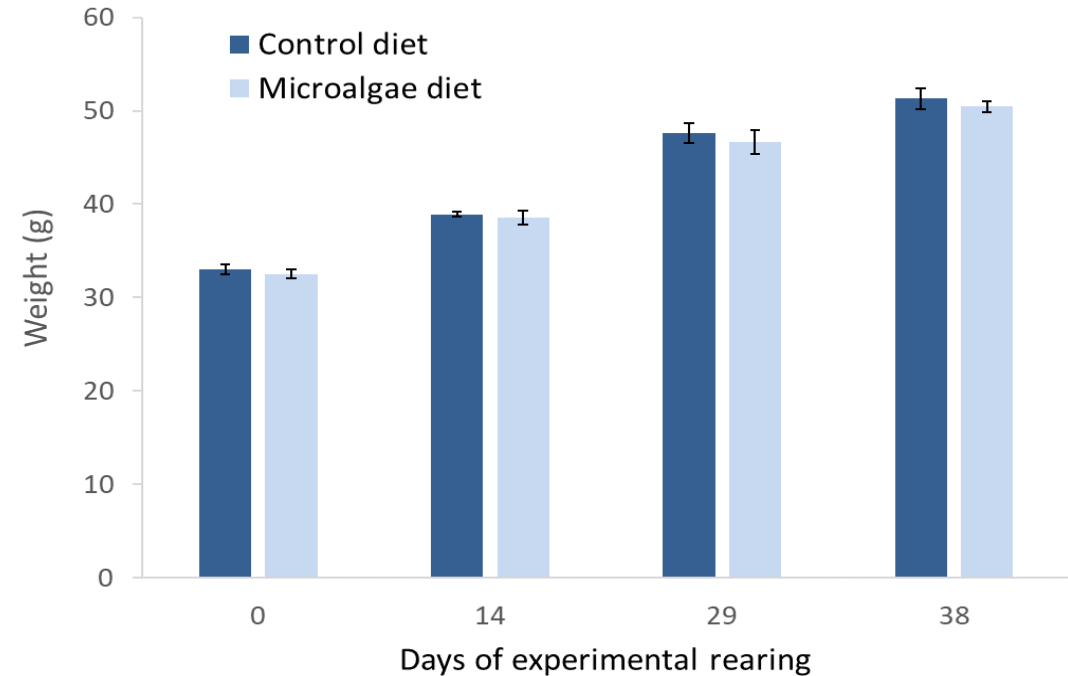
Total and Free Malondialdehyde (MDA) of control and microalgae diets

- Deux expériences de nutrition ont été menées (6 semaines avec des juvéniles et 4 semaines avec des larves).
- La survie, les performances de croissance et l'assimilation des nutriments ont été contrôlées.

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Nutrition de juvéniles de bar utilisant la biomasse d'*A. mangrovei* ALG-AG

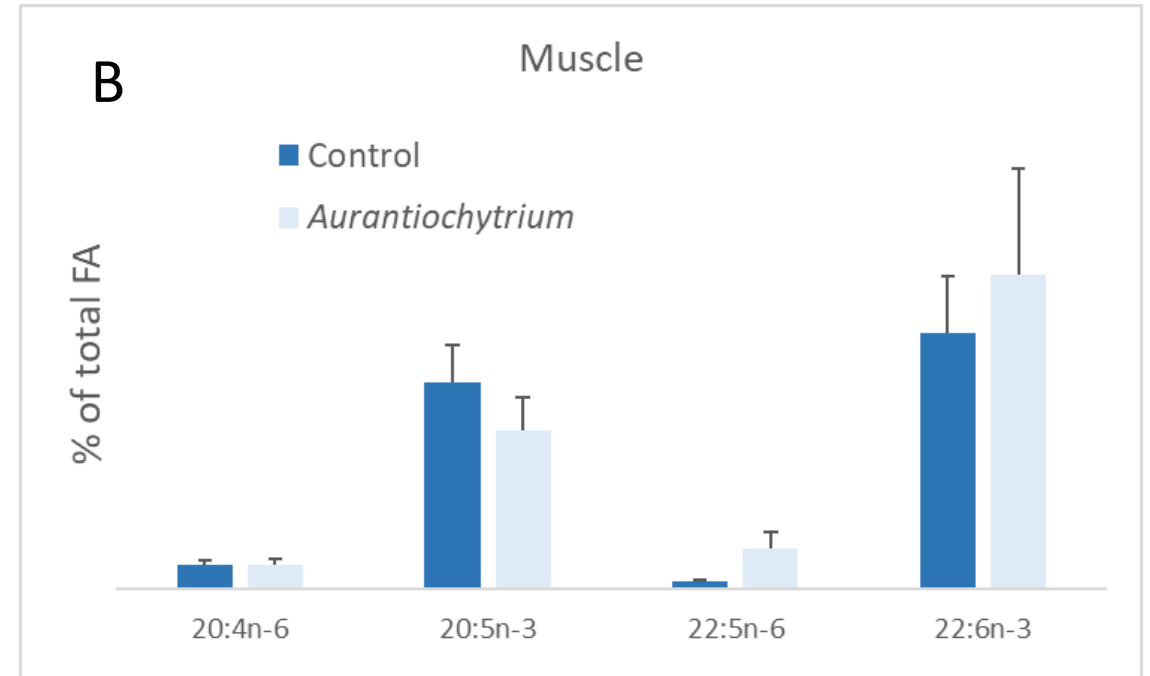
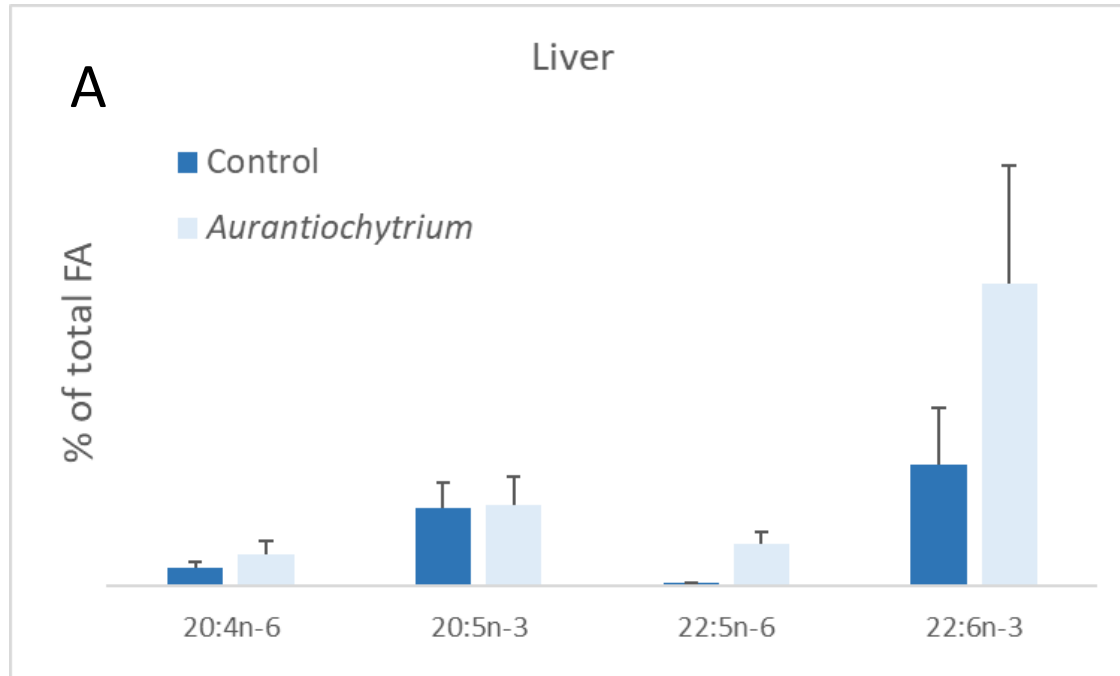


- Bonne croissance (30 à 50 g en 6 semaines) pour les juvéniles de bar (équivalent aliment témoin).
- 15% d'un aliment standard pour poissons peut être remplacé par de la biomasse d'*Aurantiochytrium*.

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Nutrition de juvéniles de bar utilisant la biomasse d'*A. mangrovei* ALG-AG

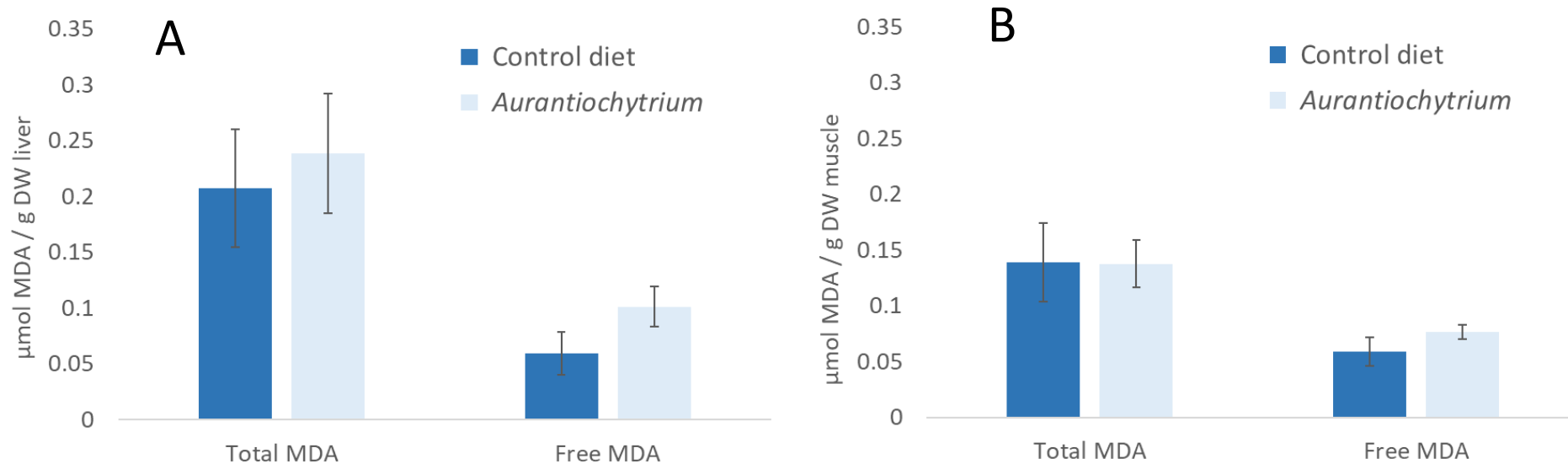


- Les AG essentiels sont 20:4n-6 = ARA ; 20:5n-3=EPA et 22:6n-3=DHA.
- Le pourcentage de DHA a considérablement augmenté dans le foie (A) et dans le muscle (B) dans une moindre mesure.
- La biomasse a bien été incorporée/assimilée.

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Nutrition de juvéniles de bar utilisant la biomasse d' *A. mangrovei* ALG-AG

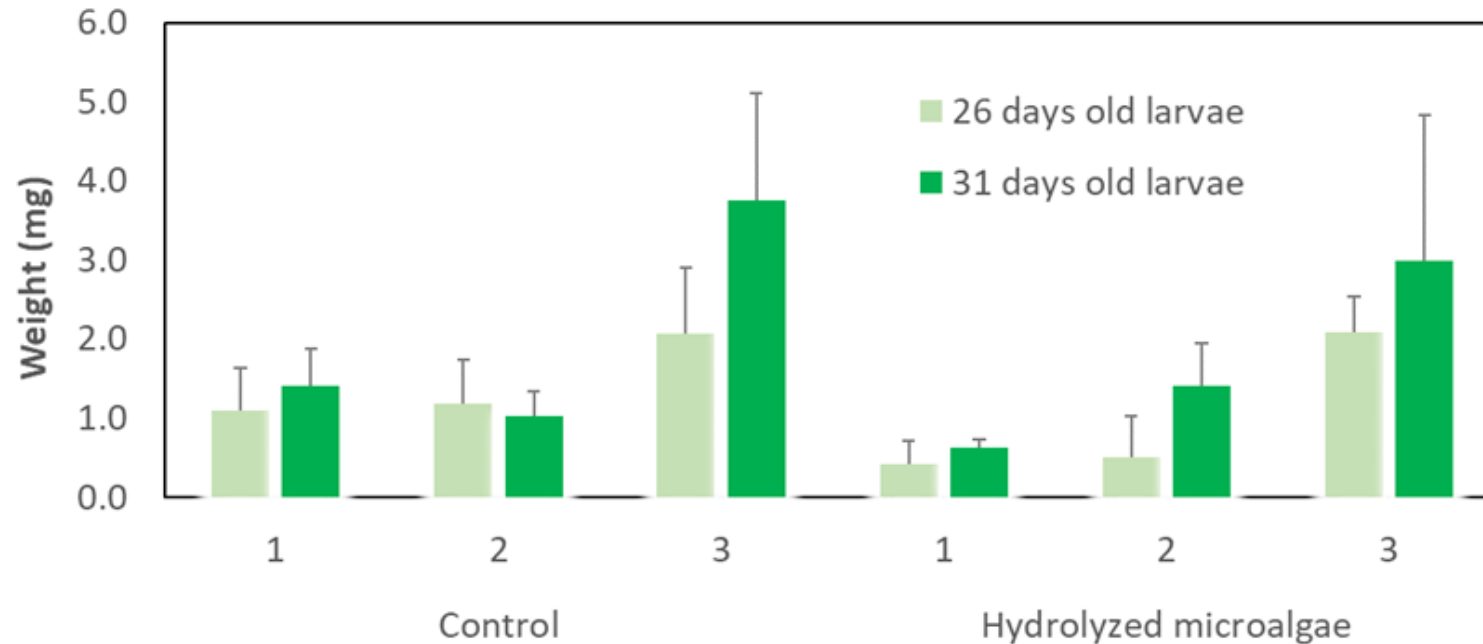


Malondialdéhyde (MDA) total et libre dans le foie (A) et le muscle (B) de bars juvéniles nourris avec le régime témoin et le régime *Aurantiochytrium* pendant 5 semaines et demi.

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Nutrition des larves de bar (âgées de 20 jours) utilisant un aliment contenant 15% de biomasse hydrolysée ALG-AD *A. mangrovei*.



- Grande variabilité entre les bassins ;
- Après 41 jours, résultats similaires entre les conditions alimentaires.

VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Conclusions sur les expérimentations de nutrition
 - La biomasse *Aurantiochytrium* non hydrolysée peut partiellement remplacer la farine et l'huile de poisson dans l'alimentation des juvéniles de bar.
 - Elle a permis d'obtenir un taux de croissance équivalent et d'améliorer l'apport en DHA des juvéniles de bar.
 - La variabilité entre les répliques de bacs de larves n'a pas permis de tirer des conclusions claires.
 - Reste à faire (et en cours) :
 - Confirmer les résultats zootechniques et biochimiques
 - Optimiser le flux des processus entre production de biomasse et fabrication de l'aliment



VALORISATION

Activité 3 : Formulation et expérimentation de nutrition

- Problématique de la sécurité sanitaire concernant la biomasse
 - Le digestat est un sous-produit animal de catégorie 2 et il est interdit de l'utiliser comme nourriture pour les animaux d'élevage.
 - Il n'existe pas de réglementations applicables aux digestats utilisés pour la culture des micro-algues.
 - La sélection des pathogènes analysés s'est basée sur la littérature scientifique évaluant l'effet de la méthanisation sur les pathogènes possiblement présents dans le lisier.
 - 2 agents pathogènes sporulants et 5 agents pathogènes non sporulants possiblement détectés dans le fumier ont été recherchés dans les digestats et les biomasses.
 - Négatif pour les bactéries non sporulantes et sporulantes (*Clostridium botulinum* et *C. difficile*) dans le digestat après filtration et dans la biomasse de microalgues

ÉVALUATION DE LA BIOMASSE D' *AURANTIOCHYTRIUM MANGROVEI* COMME INGRÉDIENT POUR L'ALIMENTATION DE JUVÉNILES DE BAR, *DICENTRARCHUS LABRAX*

Merci de votre attention

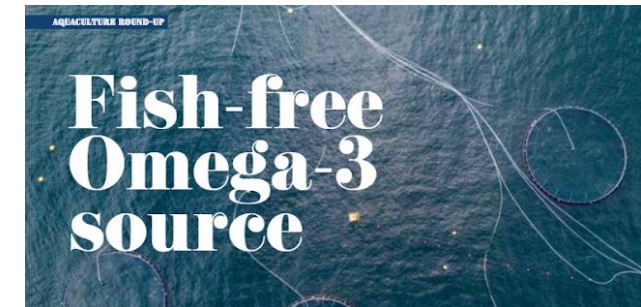


soudant@univ-brest.fr

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis

- Market analysis of microalgae
 - Microalgae : > 35000 t (DW)
 - Species : *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaleilla*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*,...
 - Mostly used in food market but also in nutraceutical, livestock feed, dye, and medical markets
 - Main processed products : Carotenoids, Phycobiliproteins, EPA/DHA (omega 3),...
 - Very little information on peptides from microalgae



<https://theaquaculturists.blogspot.com/2019/11/veramaris-wins-f3-challenge-named.html>

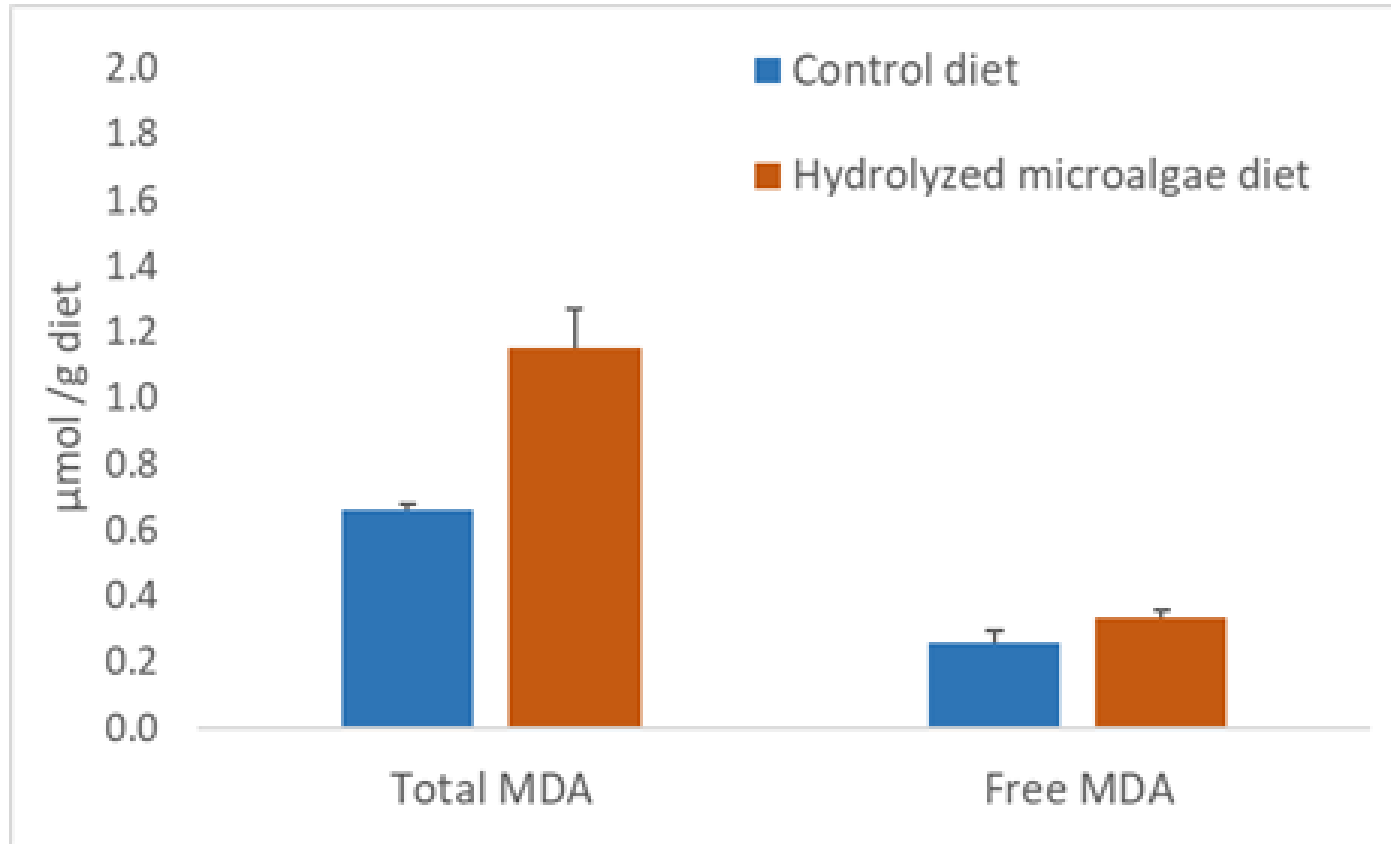
DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis

- Market analysis of microalgae
 - The case of Omega 3 (EPA+DHA)
 - Fish oil : estimated demand (70-80% or aquafeed) > 1 000 000t
 - Price: > 2000 USD/ t
 - Phototrophic production of EPA+DHA : 40 USD/kg
 - Heterotrophic production of DHA : 19 USD /kg

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis



- Total and Free Malondialdehyde (MDA) of Sea Bass larvae control and hydrolyzed microalgae micro-diets.

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation and feed trials

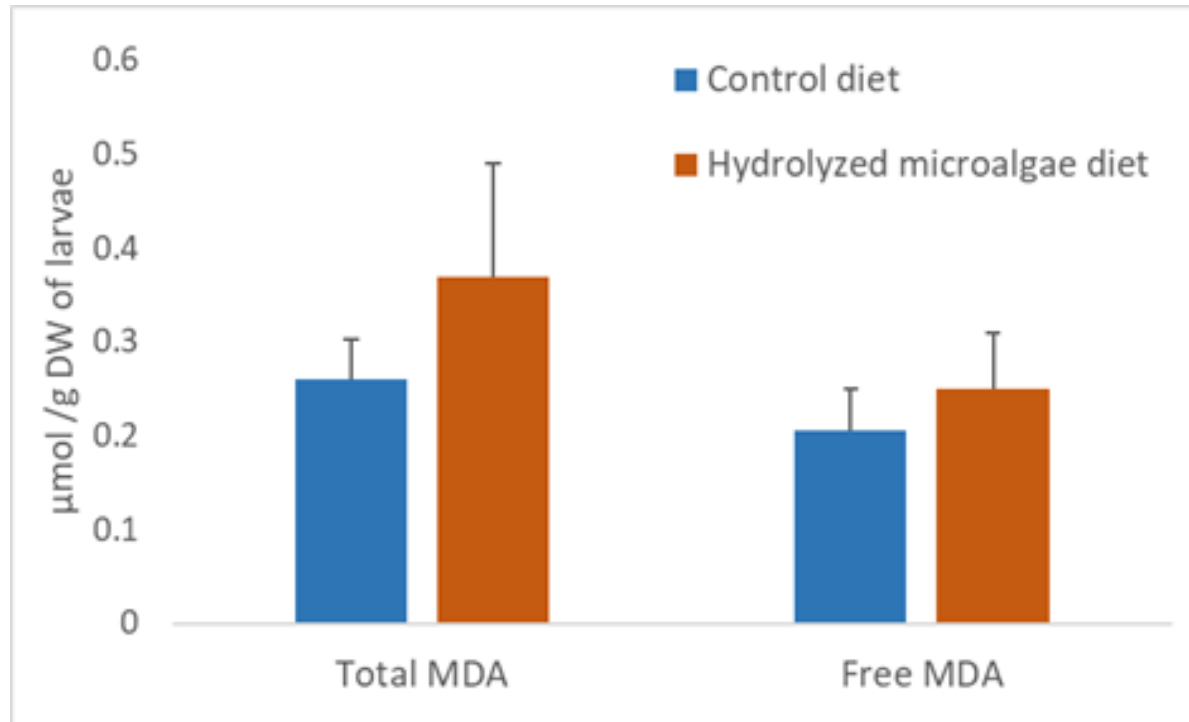
- Feed trials with **Seabass Juveniles and larvae** :
 - Fish feed was formulated with 15% of Hydrolysed (H) and non-hydrolysed (NH) dried microalgae biomasses
 - Two nutrition experiments were conducted (6 weeks with Juveniles and 4 weeks with larvae)
 - Survival, growth performance and assimilation of feed nutrients were monitored in both experiments



DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis

- Nutritional trial on Seabass larvae (20 days old) using feed containing ALG-AD *A. mangrovei* hydrolysed biomass



Total and Free MDA of Sea Bass larvae fed control, and hydrolyzed microalgae diets from day 20 to day 41 after hatching.

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis

- Safety issues

		Sampling in February 2020				Sampling in September 2020			
		Clostridium botulinum results	Comments	Clostridioides difficile results	Comments	Clostridium botulinum results	Comments	Clostridioides difficile results	Comments
Cooperl	DBF	No sampling				3+/3	enumeration < 1.3 MPN/g; Toxin GIII gene	not detected	
	DAF	not detected		not detected		not detected		not detected	
	Algae	not detected		not detected		not detected		not detected	
Innolab	DBF	No sampling				3+/3	between 1.3 and 1.6 MPN/g; Toxin A, B, GIII genes	3+/3	< 1.3 MPN/g
	DAF	3+/3	3.8 MPN/g, toxin B, GIII	1+/3	<1.3 MPN/g	3+/3	< 1.3 MPN/g, Toxin A, B, GIII genes	3+/3	< 1.3 MPN/g
			6.1 MPN/g, toxin B, GIII						
			13.0 MPN/g, toxin A,B, GIII						
	Algae	only one sample analysed, insufficient quantity of algae 1+/1	1.3 MPN/g	not detected		1+/3	1.3 MPN/g; Toxin GIII gene	2+/3	1.4 MPN/g
Langage	DBF	No sampling				3+/3	respectively 15, 64 and 110 MPN/g for GIII gene (mean: 63.0) ; 6.1 - 1.6 - 6.1 MPN/g for Toxin B gene (mean: 4.6)	1+/3	< 1.3 MPN/g
	DAF	not detected		not detected		not detected		not detected	
	Algae	not detected		not detected		not detected		2+/3	between 1.3 and 1.6 MPN/g
DBF = digestate before filtration; DAF = digestate after filtration									
								MPN: most probable number	



Evaluation of pathogen concentration in anaerobic digestate using a predictive modelling approach (ADRSK)

Rajat Nag^{1,*}, Agathe Auer², Stephen Nolan³, Lauren Russell^{1,4}, Bryan K. Markoy⁵, Paul Whyte⁶, Vincent O'Haherty⁷, Declan Bolton⁸, Owen Fenton⁹, Karl G. Richards¹, Enda Cummins⁴

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation and feed trials

- Hydrolysis (proteolysis) on concentrated biomass
 - Process development and optimisation of hydrolysis conditions at lab scale
 - Biochemical characterization of targeted products/compounds after hydrolysis
 - Application at pilot scale (300 L)
- Spray drying with antioxidants / Freeze drying by subcontractors
- Animal trials were performed with **fishes** by including hydrolysed and non-hydrolyzed biomasses in their feed

DOWNSTREAM PROCESSING :

Activity 3: Formulation, feed trials and market analysis

- Results in digestate after filtration
- negative for non-sporulating and sporulating bacteria
- Results in microalgae biomass
 - For the non-sporulating bacteria Negative
 - For the sporulating bacteria
 - *C. botulinum*: negative
 - *C. difficile*: negative